

ウメから検出されたCycas necrotic stunt virusについて

著者	丸山 千尋
著者別名	MARUYAMA Chihiro
ページ	1-76
発行年	2015-03-24
学位授与年月日	2015-03-24
学位名	修士(生命科学)
学位授与機関	法政大学 (Hosei University)
URL	http://hdl.handle.net/10114/11776

2014 年度 修士論文

ウメから検出された
Cycas necrotic stunt virus について

指導教員 西尾 健 教授

大学院理工学研究科
生命機能学専攻植物医科学領域修士課程
13R7205
マルヤマチヒロ
丸山千尋

論文題目：ウメから検出された *Cycas necrotic stunt virus* について

第一章 序論

- 1. 1 背景および目的 1

第二章 実験材料

- 2. 1 供試植物 3
- 2. 2 検定植物 6
- 2. 3 試薬 7

第三章 実験方法

- 3. 1 病徴観察 10
- 3. 2 汁液接種 10
- 3. 3 ウイルスの物理学的性質試験 10
- 3. 4 ウイルス粒子の精製 12
- 3. 5 電子顕微鏡 (TEM) 観察 16
- 3. 6 ウイルスの核酸の解析 16
- 3. 7 ウイルスの外被タンパク質の解析 17
 - 3. 7. 1 SDS-PAGE 17
 - 3. 7. 2 MALDI-TOFMS 18
- 3. 8 遺伝子学的試験
 - 3. 8. 1 ISOGEN を用いた核酸の抽出と RT-PCR 18
 - 3. 8. 2 つまようじ multiplex RT-PCR 21
 - 3. 8. 3 電気泳動 23
- 3. 9 全塩基配列の決定 24
 - 3. 9. 1 プライマーの作製 24
 - 3. 9. 2 シーケンス解析 26
- 3. 10 系統解析 28
- 3. 11 線虫伝染試験 29
- 3. 12 戻し接種 35
- 3. 13 錦性と本ウイルスとの関係性の調査 36

第四章 結果1 - CNSV の同定と特徴 -

- 4. 1 宿主範囲調査 37
- 4. 2 物理学的性質 39
- 4. 3 部分純化とウイルス粒子の形態 40
- 4. 4 核酸の特徴 41
- 4. 5 外被タンパク質の特徴 42

4. 6	<i>Nepovirus</i> 属 Subgroup 特異的プライマーを用いた RT-PCR	4 4
4. 7	塩基配列の解析	4 5
4. 8	系統解析	4 9
4. 9	Co-Pro 領域のアミノ酸配列の比較	5 0
4. 1 0	本ウイルス特異的プライマーを用いたつまようじ multiplex RT-PCR の開発	5 3
4. 1 1	線虫伝染試験	5 4
4. 1 2	ウメ実生への戻し接種	5 7
第五章 結果 2 - ウメの「錦性」と CNSV との関係性 -		
6. 1	‘日光梅’に見られた「錦性」について	5 8
6. 2	各地‘日光梅’の CNSV 感染状況調査	5 9
6. 3	各種ウメ品種の CNSV 感染状況調査	6 0
第六章 考察		
7. 1	CNSV について	6 2
7. 1. 1	ウメ分離株の特徴について	6 2
7. 1. 2	各分離株間の Co-pro 領域の相同性について	6 4
7. 1. 3	CNSV を媒介するベクターについて	6 5
7. 1. 4	CNSV の分布や感染経路について	6 6
7. 2	ウメの「錦性」と CNSV との関係性	6 7
要旨		6 8
謝辞		6 9
引用文献		7 0
参考文献		7 5

第一章 序論

1. 1 背景および目的

果樹は、実生を播いても親と同一の形質を持った個体を得ることが難しいことから、接ぎ木で繁殖させることが一般的であり、一度ウイルスに感染すると、ウイルスフリー樹から採穂する以外防除することが非常に難しいことなどから（山口, 1985）、ウイルス病が重要な病害となっている。しかし、果樹ウイルスの研究には時間がかかることや、研究可能な季節が限られることなどから、他の作物に比べて進んでいないのが現状である。近年では、海外での盆栽の人気の高まりなどによって植木や盆栽類の輸出額がここ 10 年で 10 倍となっており、海外への果樹苗木の輸出も増加しており、それに伴いウイルスを媒介する線虫等の病害虫に対する検疫上の問題も増えているという（柴田, 2012）。

果樹の中でもウメは、庭木や公園などでの観賞用や梅干しや梅酒などの食用に用いられ、古くから日本で親しまれてきた樹木である。ウメの野生種の分布は日本、朝鮮半島、台湾、中国南部に限られ、他の果樹に比べると比較的狭い地域に限定されている。我が国におけるウメの栽培面積は 17,700ha で（農林水産省 online, 2011）、果樹栽培面積全体の 7.8%と、ミカンやリンゴといった主要品目と比較すると比較的少ないということもあり、特に研究者が少ないのが現状である。しかしウメのウイルス病による被害として、近年では、輸出した梅盆栽からウイルスが検出されたり（Marais *et al.*, 2008）、また、国内では、ウメ葉縁えそ病（栗原ら, 2005）やウメ輪紋病（前島ら, 2009）などが報告され、ウイルス病による大きな被害を受けている。こうしたことから、ウメに感染するウイルスについての情報がさらに重要となっていると考える。

ウメをはじめとする核果類果樹に感染する主なウイルスには、*Foveavirus*、*Trichovirus*、*Capillovirus*、*Potyvirus* といったひも状ウイルスと *Ilarvirus*、*Nepovirus*、*Cheravirus*、*Sadwavirus*、*Cucumovirus* といった球状ウイルスが存在する。その中でも、ウメに感染することが報告されているウイルスには、Asian Prunus virus 1, 2, Apple stem grooving virus, Cherry virus A, Plum pox virus, Prunus necrotic ringspot virus, Cucumber mosaic virus 等がある（表 1）。これらの報告以外にもウメに感染しているウイルスが多数あると考えられることから、ウメに感染するウイルスの調査を行った。

ウメに感染するウイルスの調査を目的として、2012年に市販ウメ苗木42品種からウイルスの分離を試みたところ、全品種のうち3品種でウイルス様症状が観察された(表2)。「八郎」では全身に葉のモザイク症状が認められ、また「稲積」にも一部の葉にモザイク症状が認められた。「日光梅」では枝がまだらに黄化する特徴と、葉脈黄化が観察された。さらに「日光梅」から汁液接種で *Chenopodium quinoa* に全身えそ症状を呈するウイルスが分離された。そのため、「日光梅」から分離されたウイルスの同定を目的として諸性質の調査を行ってきた。2013年度からは、塩基配列の解析や、ベクターの探索などを中心に調査を行った。

また、「日光梅」に見られた枝がまだらに黄化する現象は、「錦性」と呼ばれる品種特異的な特徴であり、いくつかのウメ品種にも見られることが分かった。その様相から、ウイルスにより引き起こされていることが疑われたため、「錦性」と本ウイルスとの関係を明らかにするため調査を行った。

表1. 核果類に感染するウイルス

粒子形状	属	ウイルス名	報告
ひも状	<i>Foveavirus</i>	Asian prunus virus 1, 2	A. Maraisら、2006
		Apple stem pitting virus	
	<i>Trichovirus</i>	Apple chlorotic leaf spot virus	
	<i>Capillovirus</i>	Apple stem grooving virus	高橋ら、1990
		Cherry virus A	A. Maraisら、2008
球状	<i>Potyvirus</i>	Plum pox virus	前島ら、2009
	<i>Illavirus</i>	Prune dwarf virus	
		Prunus necrotic ringspot virus	栗原ら、2005
	<i>Nepovirus</i>	Arabis mosaic virus	
		Tomato black ring virus	
		Tomato ringspot virus	
	<i>Cheravirus</i>	Cherry rasp leaf virus	
	<i>Sadwavirus</i>	Strawberry latent ringspot virus	
	<i>Cucumovirus</i>	Cucumber mosaic virus	栗原ら、2005

ウメでの感染が報告されているウイルス

第二章 実験材料

2. 1 供試植物

本ウイルスを分離したのは2011年秋に購入し、法政大学小金井キャンパス内の圃場に定植した市販のウメ苗木品種‘日光梅’である（図1）。



図1. 本ウイルスを分離した‘日光梅’の苗木

表 2. 本ウイルス感染状況調査に供試した市販ウメ苗木

	品種	入手先	症状	汁液接種
1	豊後	群馬県渋川市	—	—
2	高田豊後	福島市荒井	—	—
3	甲州小梅	茨城県かすみがうら市宍倉	—	—
4	竜峡小梅	茨城県かすみがうら市宍倉	—	—
5	籐五郎	茨城県かすみがうら市横堀	—	—
6	花香実	茨城県かすみがうら市横堀	—	—
7	西洋梅		—	—
8	南高梅	茨城県かすみがうら市宍倉	—	—
9	小粒南高梅	茨城県かすみがうら市横堀	—	—
10	織姫	茨城県かすみがうら市横堀	—	—
11	玉英	茨城県かすみがうら市宍倉	—	—
12	梅郷	茨城県かすみがうら市宍倉	—	—
13	白加賀	茨城県かすみがうら市宍倉	—	—
14	加賀地蔵	茨城県かすみがうら市横堀	—	—
15	鶯宿	茨城県かすみがうら市宍倉	—	—
16	翠香	茨城県かすみがうら市横堀	—	—
17	八郎	茨城県かすみがうら市横堀	+	—
18	青軸	茨城県かすみがうら市横堀	—	—
19	露茜	茨城県かすみがうら市横堀	—	—
20	金紅梅	福島県福島市荒井	—	—
21	高田梅	茨城県かすみがうら市宍倉	—	—
22	節田梅	茨城県かすみがうら市横堀	—	—
23	谷沢梅	茨城県かすみがうら市横堀	—	—
24	大谷梅	茨城県かすみがうら市横堀	—	—
25	大盃	茨城県石岡市三村	—	—
26	冬至梅	茨城県石岡市三村	—	—
27	紅冬至	茨城県石岡市三村	—	—
28	紅鶴	茨城県石岡市三村	—	—
29	佐橋紅	茨城県石岡市三村	—	—
30	鹿児島紅	茨城県石岡市三村	—	—
31	都錦	茨城県石岡市三村	—	—
32	見驚	茨城県石岡市三村	—	—
33	藤牡丹	茨城県石岡市三村	—	—
34	紅千鳥	茨城県石岡市三村	—	—
35	道しるべ	茨城県石岡市三村	—	—
36	日光梅	茨城県石岡市三村	+	+
37	白雲	茨城県石岡市三村	—	—
38	金獅子	茨城県石岡市三村	—	—
39	雲竜梅	茨城県石岡市三村	—	—
40	稻積	埼玉県川口市神戸	+	—
41	紅鈴		—	—
42	越野梅		—	—

(丸山, 2012)

また、錦性と本ウイルスとの関係を明らかにするため、2011 年と 2014 年に購入した市販ウメ苗木 42 品種および各地の公園等で採取した錦性を示す 4 品種（図 2～5）を含む 10 品種、計 52 品種を本ウイルス感染状況調査に供試した。（表 2、表 3）

表 3. 各地の公園等で採取した品種

品種名	採取場所	錦性	供試株数
日光梅	神奈川県、大阪府、三重県	有	3
埴出錦	東京都	有	3
錦性埴出の鷹	東京都	有	1
埴出の鷹	東京都	有	1
東錦	神奈川県	有	1
雪灯籠	東京都	無	1
埴出の鷹枝垂れ	東京都	無	1
養老枝垂れ	東京都	無	1
翁	東京都、神奈川県	無	2
春日野	神奈川県	無	1



図 2. ‘埴出錦’



図 3. ‘錦性埴出の鷹’

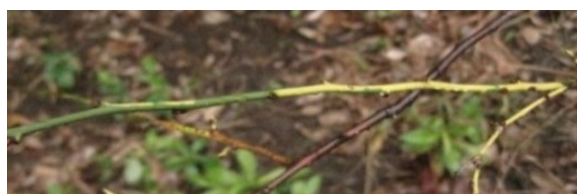


図 4. ‘東錦’



図 5. ‘埴出の鷹’

2. 2 検定植物

汁液接種による宿主範囲調査等にあかざ科やナス科などを中心に 12 科 24 属 38 品種の検定植物を使用した（表 4）。

表 4. 使用した検定植物

科名	種名	和名
Chenopodiaceae（アカザ科）	<i>Chenopodium quinoa</i>	キノア
	<i>C. foetidum</i>	
	<i>C. amaranticolor</i>	
	<i>C. murale</i>	
	<i>Spinacia oleracea</i> L.	ホウレンソウ
Solanaceae（ナス科）	<i>Capsicum annuum</i> L. Grossum group	ピーマン
	<i>Lycopersicon esculentum</i> ‘Odoriko’	トマト
	‘Momotaro’	
	<i>Nicotiana occidentalis</i>	
	<i>N. benthamiana</i>	
	<i>N. tabacum</i> ‘White Burley’	
	<i>N. tabacum</i> ‘Xanthi-NC’	
	<i>N. tabacum</i> ‘Samsun’	
	<i>N. tabacum</i> ‘Samsun-NN’	
	<i>N. tabacum</i> ‘Bright Yellow’	
	<i>N. rustica</i>	
	<i>Petunia</i> × <i>hybrida</i>	ツクバネアサガオ
	<i>Physalis floridana</i>	
Asteraceae（キク科）	<i>Xanthophthalmum coronarium</i> ‘Tokinashi-gosun’	シュンギク
	<i>Tagetes</i> sp.	
Leguminosae（マメ科）	<i>Glycine max</i> ‘Tsurunoko-daizu’	ダイズ
	‘shiratori-edamame’	エダマメ
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	インゲンマメ
	<i>Pisum sativum</i>	エンドウ
	<i>Vicia faba</i>	ソラマメ
Aizonaceae（ハマミズナ科）	<i>Tetragonia expansa</i>	ツルナ
Cucurbitaceae（ウリ科）	<i>Cucumis sativus</i>	キュウリ
	<i>Cucurbita maxima</i> ‘Butter cup’	カボチャ
Amaranthaceae（ヒユ科）	<i>Celosia cristata</i>	ケイトウ
	<i>Gomphrena globosa</i>	センニチコウ
Caryophyllaceae（ナデシコ科）	<i>Dianthus</i> sp.	
Brassicaceae（アブラナ科）	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i>	ブロッコリー
	<i>Brassica rapa</i> L. var. <i>perviridis</i> ‘hamami-2go’	コマツナ
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> ‘fujiwase’	キャベツ
	<i>Raphanus sativus</i> var. <i>longipinnatus</i> ‘kenka37go’	ダイコン
Apiaceae（セリ科）	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>Sativus</i>	ニンジン
Polygonaceae（タデ科）	<i>Fagopyrum esculentum</i>	ソバ
Alliaceae（ネギ科）	<i>Allium fistulosum</i>	ネギ

2. 3 試薬

◆汁液接種および物理学的性質試験用試薬

1. 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0)

汁液接種および物理学的性質試験の磨砕用バッファーとして使用した。

a : リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4) 13.6g

蒸留水 1,000ml

b : リン酸水素ナトリウム二水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 17.8g

蒸留水 1,000ml

MAGNETIC STIRRER IS-3C (池田理化社製) で攪拌しながら a に b を注ぎ pH メーター F-54 (堀場製作所製) で pH7.0 に調節した。その後、0.1% チオグリコール酸を加えた。また、物理学的性質試験にはチオグリコール酸を加えていないものを使用した。

◆純化用試薬

1. 0.1M リン酸緩衝液 (pH8.0)

磨砕と懸濁用緩衝液として使用した。

a : リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4) 13.6g

蒸留水 1,000ml

b : リン酸水素ナトリウム二水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 17.8g

蒸留水 1,000ml

攪拌しながら a に b を注ぎ、pH メーターで pH を 8.0 にあわせた。その後、10mM N,N-ジエチルジチオカルバミド酸ナトリウム三水和物 (Na-DIECA) , 20mM 亜硫酸ナトリウム (Na_2SO_3) , 20mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を加えた。

2. 0.05M リン酸緩衝液 (pH7.0)

懸濁用バッファーとして使用した。

a : リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4) 6.8g

蒸留水 1,000ml

b : リン酸水素ナトリウム二水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 8.9g

蒸留水 1,000ml

攪拌しながら a に b を注ぎ、pH メーターで pH を 8.0 にあわせた。その後、5mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を加えた。

3. 10-40%ショ糖密度勾配溶液

10-40%ショ糖密度勾配遠心に使用した。

(10%ショ糖水溶液の場合)

スクロース 10g ※40%ショ糖水溶液の場合は 40g を加えた。

蒸留水 100ml

上記の用量で 10%ショ糖水溶液と 40%ショ糖水溶液を作製した後、10%ショ糖水溶液、40%ショ糖水溶液の順番に、注射器 (20ml) (TERUMO 社製) を用いて遠心分離用チューブ (SW32Ti 用) (BECKMAN COULTER 社製) に分注した。その後、グラジエント・ステーション (BIOCOMP 社製) で密度勾配溶液を作製した。

◆SDS-PAGE 電気泳動用試薬 (稲田・塩見、2008)

1. SDS-PAGE 電気泳動用緩衝液

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Tris) 1.5g

グリシン 7.2g

これらを 400ml の蒸留水に溶解した後、500ml までメスアップした。メスアップ後に、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を 0.5g 加えて溶解した。

◆核酸の解析用試薬

1. 10×MOPS 緩衝液

アガロースゲルの作製、RNA サンプルの調製、電気泳動に使用した。

MOPS 20.9g

酢酸ナトリウム 0.82g

0.5M EDTA (pH8.0) 10ml

これらを蒸留水 450ml に溶解し、NaOH を用いて pH を 7.0 にあわせた後、500ml にメスアップした。

2. 2.2M ホルムアルデヒド-1.5%アガロースゲル

電気泳動に使用した。

アガロース 0.75g

蒸留水 36ml

これらを電子レンジで加熱・攪拌を 3 回程度繰り返してアガロースを完全に溶解した。温度が 60℃くらいまで下がったところで、ドラフト内で以下の試薬を加えた。

10×MOPS 緩衝液 5.0ml

ホルムアルデヒド溶液 9.0ml

これらを泡立たないように攪拌し、直ちにゲルトレイをセットしたゲルメーカースタンドに流し込み、コームを挿した(ゲルメーカーセットはMupid社製)。

◆RT-PCR 用試薬

1. 1×TAE

アガロースゲルの作製および電気泳動用緩衝液として使用した。多量に使用するため、50 倍濃度の TAE (50×TAE) を作製し、保存用とした。

・ 50×TAE

Tris 60.5g

酢酸 14.28g

0.5M EDTA 25ml

これらを蒸留水 200ml で溶解した後、250ml までメスアップした。

・ 1×TAE

50×TAE20ml を蒸留水 980ml に混合し、溶解した。

2. 1%または2%アガロースゲル

電気泳動に使用した。

(1%アガロースゲルの場合)

アガロース 1g ※2%の場合は 2g を加えた。

1×TAE 100ml

これらを混合し、電子レンジで加熱・攪拌を 3 回程度繰り返してアガロースを完全に溶解した。アガロース溶液の温度が 60℃程度まで下がったことを確認した後、ゲルトレイをセットしたゲルメーカースタンドに流し込み、コームを挿し、静置した。ゲルが完全に固まったことを確認した後、1×TAE の中で保存した。

3. エチジウムブロマイド (EtBr) 溶液

電気泳動後の PCR 産物の染色に使用した。

10 µl/ml EtBr 10 µl

1×TAE 150ml

これらを混合し、攪拌した。

第三章 実験方法

3. 1 病徴観察

2012 年春から、小金井キャンパス内の圃場に定植した市販ウメ苗木‘日光梅’の観察を行った。初年度は、春（4 月～5 月）と秋（11 月）に観察を行い、その後も同様に適宜観察を行った。写真撮影をして記録した。

3. 2 汁液接種

2012 年 5 月に採取した品種‘日光梅’の新葉を *C. quinoa* に汁液接種し、明瞭な病徴が現れた株を分離株とした。これを宿主範囲調査の接種源として使用した。

氷冷した乳鉢に、病徴を示した接種源の比較的若い葉と磨砕用緩衝液を適量入れ、よく磨砕した。磨砕用緩衝液には、0.1M リン酸緩衝液（pH7.0）に 0.1% チオグリコール酸を入れたものを使用した。磨砕液にカーボランダム（昭和電工社製）を加え、綿棒に磨砕液を染み込ませ、検定植物（表 4）の葉の表面を軽くこするように接種した。接種後すぐに、磨砕液およびカーボランダムを水で洗い流した。接種した植物は温室で管理し、適宜観察を行い、現れた病徴を詳しく観察するとともに、写真撮影を行った。なお、緩衝液をカーボランダム処理し接種した対照区を作製し、比較観察した。

3. 3 ウイルスの物理学的性質試験

ウイルスの物理学的性質は、ウイルスの属やウイルスごとに異なり、不明ウイルスを同定する際の一つの判断材料となる（植物病理実験法, 1962）。いずれの試験も、接種源はウイルス濃度が最も高くなると予想される接種後約 20 日の *C. quinoa* 罹病葉を用いた。検定植物は *C. quinoa* を使用した。

A: 耐熱性試験（不活性化温度、高温に対する抵抗性）

試験区

1) 磨砕液に 0.1M リン酸緩衝液を用いた区

①40℃ ②50℃ ③52℃ ④54℃ ⑤56℃ ⑥58℃ ⑦60℃ ⑧65℃

⑨ 70℃ ⑩室温（コントロール）

2) 磨砕液に蒸留水を用いた区

①40℃ ②50℃ ③52℃ ④54℃ ⑤56℃ ⑥58℃ ⑦60℃ ⑧65℃

⑨70℃ ⑩室温（コントロール）

恒温器、スターラー、温度計をセッティングし、恒温器内の水をあらかじめ温度区の最低温度まで温めておく。*C. quinoa* 罹病葉を 4g 採集し、カミソリでみじん切りに刻み良く混ぜて均等にする。乳鉢に 2g ずつ分けて、それぞれに 0.1M リン酸緩衝液（pH7.0）と蒸留水を 20ml ずつ加える。罹病葉を磨砕後、汁液を遠心チューブに移し、遠心にかけて（5,000rpm 10 分間 4℃）。上清を別の遠心チューブに移し、各区 10 本の試験管に、汁液を同量ずつ分注した。両試験区同時に、最低温度に温まった恒温器に試験管を入れ、10 分間温めた。10 分経ち次第すぐに氷あるいは氷水の中に試験管を入れ、急冷させる。温度を上げていき、すべての温度区の熱処理が終了したら、各区の汁液を、*C. quinoa* 3 株ずつにカーボランダムを用いた汁液接種を行った。*C. quinoa* 3 株中、1 株以上の株で病徴が確認された温度区を陽性とした。（植物病理実験法, 1962）

B：耐希釈性試験（希釈限度、希釈に対する影響）

試験区（磨砕液は蒸留水を用いた）

① 10^{-1} (10) 倍 ② 10^{-2} (100) 倍 ③ 10^{-3} (1,000) 倍 ④ 10^{-4} (10,000) 倍
⑤ 10^{-5} (100,000) 倍 ⑥ 10^{-6} (1,000,000) 倍 ⑦原液（コントロール）

C. quinoa 罹病葉の良く病徴の出た部分を接種源として使用した。*C. quinoa* 罹病葉の量に対して 10 倍の蒸留水で磨砕し、搾汁を得た。まず 10 倍希釈液は搾汁：蒸留水＝1：9 の割合に加え、100 倍液は 10 倍希釈液：蒸留水＝1：9 の割合に加えた。以後同様に希釈した。搾汁はマイクロピペットを用いて正確に測った。作製した希釈液をカーボランダムを用いて *C. quinoa* 各試験区 3 株ずつに接種した。接種の際にはコンタミネーションを防ぐために、希釈度の高いものから始め、最後にコントロール区を接種した。接種した *C. quinoa* 3 株中、1 株以上の株で病徴が確認された区を陽性とした。（植物病理実験法, 1962）

C：耐保存性試験（汁液中における感染力保持期間）

試験区

1) 磨砕液に 0.1M リン酸緩液を用いた区

①1 日目（コントロール）②2 日目 ③8 日目 ④11 日目 ⑤16 日目
⑥18 日目 ⑦22 日目 ⑧25 日目 ⑨30 日目 ⑩36 日目 ⑪40 日目
⑫40 日目 ⑬54 日目 ⑭61 日目

2) 磨砕液に蒸留水を用いた区

①1 日目（コントロール）②2 日目 ③8 日目 ④11 日目 ⑤16 日目
⑥18 日目 ⑦22 日目 ⑧25 日目 ⑨30 日目 ⑩36 日目 ⑪40 日目

⑫40 日目 ⑬54 日目 ⑭61 日目 ⑮78 日目 ⑯89 日目

C. quinoa 罹病葉の良く病徴の出た部分を接種源として使用した。*C. quinoa* 罹病葉をカミソリでみじん切りにして病徴を均一にし、半分に分けた。それぞれ *C. quinoa* の量に対して 10 倍の 0.1M リン酸緩衝液と蒸留水で磨砕した。それぞれを遠心チューブに移し、遠心にかけ (10,000rpm 30 分間 4℃)、粗植物組織を除き、清澄な上清を各区約 20 本のエッペンチューブに分注し、室温 (20℃) で保存した。接種した *C. quinoa* 3 株中 1 株以上の株で病徴が確認された区を陽性とした。(植物病理実験法, 1962)

3. 4 ウイルス粒子の精製

ウイルスの純化方法は、楠木ら (1986) の方法を参考に行った (図 6)。本ウイルスに感染した罹病 *C. quinoa* を 2 倍量の 0.1M リン酸緩衝液 (pH8.0) (10mM Na-DIECA, 20mM Na₂SO₄, 20mM EDTA を含む) で磨砕し、3 重にしたガーゼで濾過した。その粗汁液に、クロロホルム (100ml) を加え、1 時間冷蔵庫内で攪拌し、その後、低速で遠心 (10,000×g 10 分間) を行った。得られた上清を超遠心 (100,000×g 2 時間) にかけて、その沈殿を 0.1M リン酸緩衝液 (pH8.0) (10mM Na-DIECA, 20mM Na₂SO₄, 20mM EDTA を含む) で溶解し、低速遠心 (10,000×g 10 分間) を行った。超遠心と低速遠心は全部で 4 回繰り返し、4 回目の沈殿は、0.05M リン酸緩衝液 (pH7.0) (5mM EDTA を含む) で溶解した。得られた上清を 10-40%ショ糖密度勾配遠心 (55,000×g 3 時間 ※no brake) で精製した。得られたバンド部分を回収し、超遠心 (100,000×g 2 時間) を行った後、沈殿を溶解したものを部分純化試料とした。

この方法では、高い精製度で本ウイルスを純化することができた (図 6)。しかし、これ以前に何度か試みていた方法ではうまく精製することができなかった。その主な方法を図 7 に示した。罹病 *C. quinoa* を 3 倍量の 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) で磨砕し、3 重にしたガーゼで濾過した。その粗汁液に対して 8% のクロロホルムとブタノールを加え、2 時間冷蔵庫内で攪拌し、低速で遠心 (10,000×g 5 分間) を行った。得られた上清に対して 8% のポリエチレングリコール (PEG) と 0.2M の NaCl を加え、冷蔵庫内で 3 時間攪拌し、低速で遠心 (10,000×g 30 分間) を行った。その沈殿を 0.01M リン酸緩衝液 (pH7.0) で溶解し、低速遠心 (10,000×g 10 分間) と超遠心 (90,000×g 2 時間) を計 2 回繰り返した。その後、10-40%ショ糖密度勾配遠心 (110,000×g 2 時間 ※no brake) で精製した。得られたバンド部分を回収し、超遠心 (100,000×g 2 時間) を行った後、沈殿を溶解したものを部分純化試料とした。

後者の方法では、10-40%ショ糖密度勾配遠心前の試料を用いて電子顕微鏡観

察を行うと、部分的にまとまったウイルス粒子が観察されるにも関わらず、密度勾配遠心後の試料では粒子がほとんど観察されないといったことが複数回見られた。この原因が、ショ糖密度勾配溶液の作製方法に問題があったことにあると考えられたため、40%ショ糖溶液にのみブROMOFENOLブルー染色液を混合してショ糖密度勾配溶液を作製し、密度勾配がうまく作製できているかどうか確認を行ったが、問題がある様子は認められなかった。そこで、前者と後者の方法の違いを比較して原因を考察した。後者に対して前者では、罹病植物を磨砕する緩衝液に酸化酵素阻害剤の Na-DIECA やキレート剤の EDTA を添加したこと、また、PEG による沈殿を行わなかったことが大きな違いである。Na-DIECA は植物汁液中の酵素によってウイルス粒子が不活化されるのを防ぎ、EDTA はウイルス活性の保持と宿主成分の除去に効果があるとされていることから、後者に比べて前者ではウイルス粒子が壊れにくく、また宿主成分が除去されやすかったと考えられる。また、PEG による沈殿を行わなかったため、超遠心を4回行った後の沈殿でもかなり濁った黄色い色をしていたが、その分ウイルス粒子のロスが少なく、ショ糖密度勾配遠心でバンドになるだけの十分な濃度が確保されたと考えられる。このことから、本ウイルスの精製には Na-DIECA や EDTA 等の添加物を緩衝液に加えること、また、PEG 沈殿は行わず分画遠心で精製する、もしくは PEG を加える濃度を下げて沈殿を行うのが良いと考えられた。

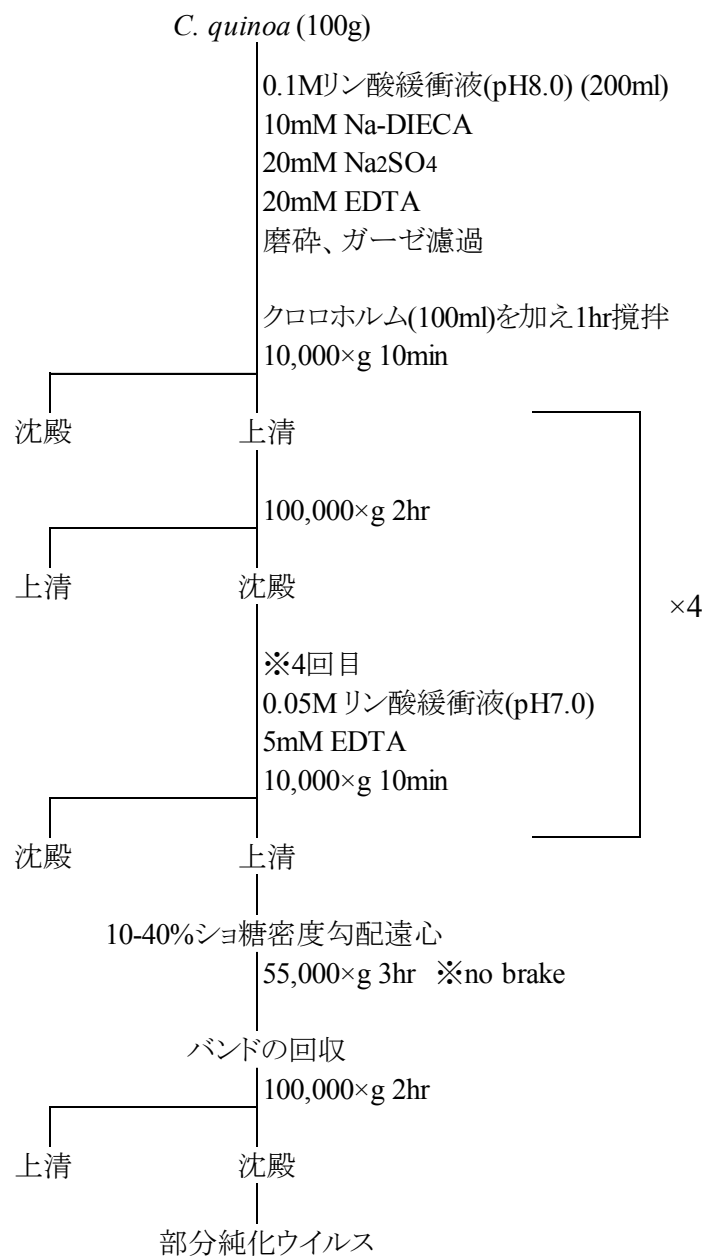


図6．本ウイルスの部分純化方法

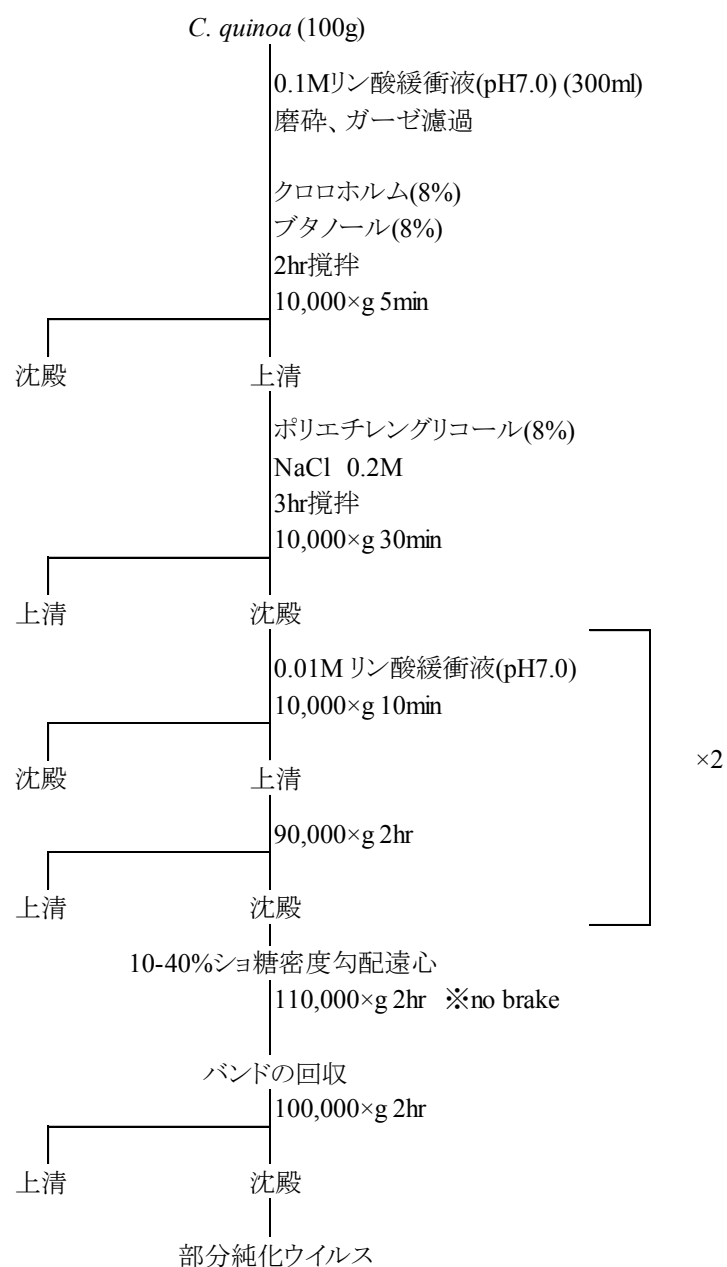


図7. 本ウイルスの部分純化方法（うまく精製できなかったもの）

3. 5 電子顕微鏡 (TEM) 観察

本ウイルスの部分純化試料をネガティブ染色法で染色した。染色液は 2% リンタングステン酸 (PTA) を使用した。スライドガラス上で PTA と部分純化試料を 1 : 1~10 : 1 程度の割合で混合し、その溶液の上にグリッド (日本 EM 社製) を乗せて試料を吸着させた。グリッドをキムワイプ (日本製紙クレシア社製) 上でよく乾燥させた後、透過型電子顕微鏡 (TEM) (日立ハイテック社製) で観察を行った。

3. 6 ウイルスの核酸の解析

◆ 部分純化産物の核酸抽出

部分純化試料の核酸抽出は、以下の方法で行った (佐藤, 1983)。

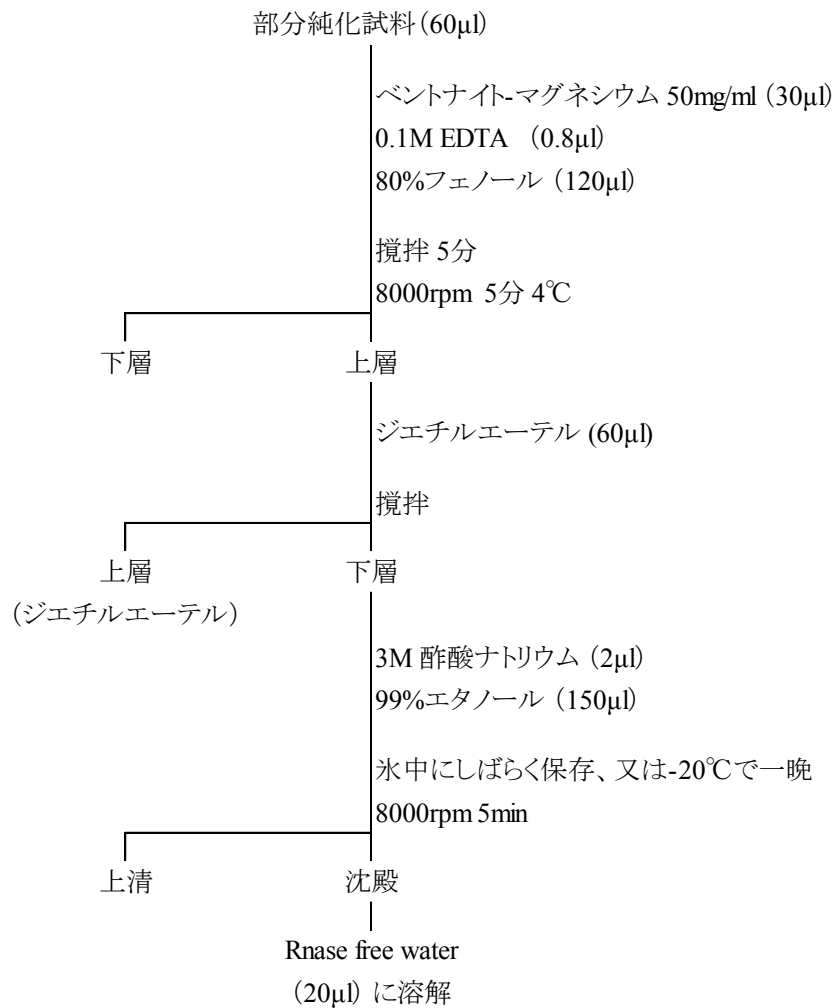


図 8. 部分純化産物の核酸抽出方法

◆RNA サンプルの調製

抽出した適当量の RNA (約 $3\mu\text{g}$) を含んだ RNA 溶液 $3.0\mu\text{l}$ に下記の試薬を加えて攪拌した。

10×MOPS バッファー $2.0\mu\text{l}$

ホルムアルデヒド溶液 $4.0\mu\text{l}$

ホルムアミド $10.0\mu\text{l}$

0.2mg/ml エチジウムブロマイド $1.0\mu\text{l}$

RNA の高次構造を解くため、ヒートブロック (TAITEC 社製) で、 55°C 一時間インキュベートした。その後、氷上で約 10 分間冷却した後、10×ローディングバッファーを $2.0\mu\text{l}$ 加えた。(稲田利文・塩見春彦, 2008)

◆電気泳動

10×MOPS バッファーを蒸留水で 1×に希釈し、泳動槽 (Mupid 社製) に満たした。これに、作製した 2.2M ホルムアルデヒド-1.5%アガロースゲルを沈めた。ゲルがセットできたら、ゲル中のイオン環境をゲルバッファーと同じに整えるため、5mA、42V 定電圧で 5~10 分間プレ泳動した。プレ泳動後のアガロースゲルに、約 $10\mu\text{l}$ の調製した RNA サンプルをアプライし、5mV、42V 定電圧で、ブロモフェノールブルーがゲル先端に達する位まで (約 2 時間) 泳動した。泳動後は、UV トランスイルミネーター (ATTO 社製) で励起しながら、写真撮影を行った。(稲田利文・塩見春彦, 2008)

3. 7 ウイルスの外被タンパク質の解析

3. 7. 1 SDS-PAGE

◆サンプルの調製

サンプルバッファーは、ATTO 社製の AE-1430 EzApply を使用した。泳動サンプルは、部分純化試料と対照区として健全 *C. quinoa* 葉を置いた。エッペンチューブ内に純化産物 $2\mu\text{l}$ と 2×サンプルバッファー $18\mu\text{l}$ を入れて混合した。対照区の健全 *C. quinoa* 葉は 5mm 角に切り、エッペンチューブ内で 1×サンプルバッファー $60\mu\text{l}$ を入れ、マイクロ乳棒 (ペッスル) を用いて磨砕した。その後、いずれのサンプルも 95°C で 5 分間処理し、その後氷上で冷却した。

◆SDS-PAGE

電気泳動槽 (PageRun : ATTO 社製) に、作製した SDS-PAGE 電気泳動用バッファー約 400ml を泡立てないように注いだ。プレートホルダーに 15%ポリアクリルアミドゲル (e・PAGEL : ATTO 社製) をセットし、ダミープレート

が装着されていることを確認した後、上部槽を下部槽に沈めた。上部槽の上部に残りの泳動バッファを注いだ。その後、泳動サンプルをウェルに $20\mu\text{l}$ ロードした。また、分子量マーカーは Precision Plus Protein Standards (BIO RAD 社製) を使用した。泳動は、 20mA で 75 分程度行った。

◆CBB 染色

泳動が終了した e・PAGE の泳動プレートから、ポリアクリルアミドゲルを丁寧にはがし、蒸留水に浸け、5 分間振盪洗浄した。その後、水を捨てて再び蒸留水で洗浄した。この操作を合計 3 度繰り返した。その後、Quick-CBB PLUS (和光社製) を 25ml を加え 30 分間振盪し、染色を行った。その後染色液を回収し、蒸留水で 30~60 分程度振盪洗浄し、脱色を行った。

3. 7. 2 MALDI-TOFMS

SDS-PAGE、CBB 染色で確認された部分純化産物特異的なバンドを、それぞれ切り取りエッペンチューブに回収した。サンプルの解析は、GENOMINE 社に依頼した。解析結果はサンプルを送付後約 2 週間で返送され、確認をした。

3. 8 遺伝子学的試験

3. 8. 1 ISOGEN を用いた核酸の抽出と RT-PCR

◆ISOGEN を用いた核酸の抽出

サンプルとなる植物の良く病徴の出ている若い葉を選び、カミソリで $1\sim 2\text{cm}$ 角程度に切り出し、乳鉢内で液体窒素を用いて磨砕した。サンプルが融解する前に ISOGEN (ニッポン・ジーン社製) を 1ml 入れて、さらに磨砕した。磨砕液の全量を 1.5ml チューブに移し、クロロホルム $200\mu\text{l}$ を加えて、1 分間ボルテクスミキサーで攪拌した。その後、遠心分離機で遠心 ($15,000\text{rpm}$ 5 分間, 室温) を行い、上の水層を別の 1.5ml チューブに回収した。回収した溶液に 2-ブロパノールを $500\mu\text{l}$ 加え、1 分間ボルテクスミキサーで攪拌し、遠心分離機にかけた ($15,000\text{rpm}$ 10 分間 室温)。廃液を捨て、70%エタノールを 1ml 加え、再度遠心分離機にかけた ($15,000\text{rpm}$ 5 分間 室温)。下に沈殿したペレットを崩さないようにデカンテーションを行い、残った上清をマイクロピペッターで丁寧に取り除いた後、真空乾燥機 (東京理化器械社製) で約 20 分間乾燥させた。最後に、RNase free water を $50\mu\text{l}$ 加え、ボルテクス (Scientific Industries 社製) を用いて軽く攪拌を行い RNA を溶解した。出来上がった RNA 溶液は、 -80°C の冷凍庫で保存した。

◆RT-PCR

1) 使用したプライマー

本ウイルスの同定には、*Nepovirus* 属 Subgroup 特異的プライマー (Way T and Clover G, 2008) を使用した (表 5)。また、他の試験で使用したプライマーについては、後ほど各項 (p22, 24, 25) で説明する。

表 5. *Nepovirus* 属 Subgroup 特異的プライマー

プライマー名	配列 (5'-3')	位置	サイズ	引用	
(Nepovirus 属 Subgroup A)					
NepoA-F	ACDTCWGARGGITAYCC	RdRp gene	～340bp	Way T. and Clover G. (2008)	
NepoA-R	RATDCCYACYTGRCWIGGCA				
(Nepovirus 属 Subgroup B)					
NepoB-F	TCTGGITTTGCTTTRACRGT	RdRp gene	～250bp		
NepoB-R	CTTRTCACTVCCATCRGTAA				

2) RT-PCR (2 step)

RNA PCR™ Kit (AMV) Ver.3.0 (タカラバイオ社製) を使用した。また、シーケンス解析のための PCR では、PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (タカラバイオ社製) を使用した。

① 逆転写反応 (RT)

PCR チューブに下記に示す反応液を調整した。

表 6. 逆転写反応に使用した試薬

試薬	使用量 (1 sample)	最終濃度
MgCl ₂	2μl	5mM
10 × RT Buffer	1μl	1×
RNase Free water	3.75μl	
dNTP Mixture	1μl	1mM
RNase Inhibitor	0.25μl	1U/μl
AMV Reverse Transcriptase XL	0.5μl	0.25U/μl
特異的 PCR プライマー (Reverse) (20μM)	0.5μl	1.0μM
抽出RNA	1μl	100～150ng total RNA
total	10μl	

マイクロ遠心機で約 10 秒間遠心し、反応液をチューブの底に集めた後、調整したチューブをサーマルサイクラーにセットし、以下の条件で反応を行った。

表 7. 逆転写反応の温度条件

温度	時間
42°C	25min.
95°C	5min.
4°C	∞

② PCR 反応

(RNA PCR™ Kit (AMV) Ver.3.0 を使用した場合)

PCR チューブに下記に示す反応液を調製した。

表 8. RNA PCR™ Kit (AMV) Ver.3.0 を用いた PCR 反応に使用した試薬

試薬	使用量 (1 sample)	最終濃度
Template DNA	10μl	
5 × PCR Buffer	10μl	1×
滅菌蒸留水	29.25μl	
TaKaRa Ex Taq HS	0.25μl	1.25 U/50 μl
特異的PCR プライマー(Forward) (20 μM)	0.5μl	0.2 μM
total	50μl	

マイクロ遠心機で約 10 秒間遠心し、反応液をチューブの底に集めた後、調整したチューブをサーマルサイクラーにセットし、以下の条件で反応を行った。

表 9. *Nepovirus* 属 Subgroup 特異的プライマーの反応条件

温度	時間	
94°C	5min.	
94°C	35sec.	} ×35
50°C	45sec.	
72°C	35sec.	
72°C	7min.	
4°C	∞	

(PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase を使用した場合)
PCR チューブに下記に示す反応液を調製した。

表 1 0. PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase を用いた PCR 反応に使用した試薬

試薬	使用量 (1 sample)	最終濃度
Template DNA	10 μ l	100~150ng total DNA
5 \times PrimeSTAR Buffer	10 μ l	1 \times
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	4 μ l	
20 μ M Forward primer	0.5 μ l	0.2 μ M
20 μ M Reverse primer	0.5 μ l	0.2 μ M
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ μ l)	0.5 μ l	
滅菌蒸留水	24.5 μ l	
total	50 μ l	

マイクロ遠心機で約 10 秒間遠心し、反応液をチューブの底に集めた後、調整したチューブをサーマルサイクラーにセットし、以下の条件で反応を行った。

表 1 1. PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase を用いた PCR の反応条件

温度	時間	
98 $^{\circ}$ C	10sec.	} $\times 30$
55 $^{\circ}$ C	5sec.	
72 $^{\circ}$ C	1min./kb	

3. 8. 2 つまようじ multiplex RT-PCR

この方法は、遠藤ら (2014) が開発した、つまようじ multiplex RT-PCR (tm RT-PCR) を用いた簡易診断方法を応用した。植物体をつまようじで軽く数回つつくことで RNA の抽出が完了するため、通常より簡便かつ迅速な RT-PCR を行なうことができる。また、すべての真核生物に含まれる 18S rRNA を増幅させるプライマーを用いて、内部標準を置くことで、つまようじによる RNA の抽出がうまく行われたかどうか判断が可能である。

この方法は、本ウイルスの感染状況調査や、戻し接種試験等で多量のサンプルを検定する際に使用した。

1) 使用したプライマー

つまようじ **multiplex RT-PCR** には、本ウイルスの塩基配列から作製した **CNSV** 特異的プライマーを使用した(表 1 2)。また、内部標準として、**18S rRNA** を増幅するプライマー (遠藤作製, 2014) を使用した。

表 1 2. つまようじ **multiplex RT-PCR** に使用したプライマー

プライマー名	配列 (5'-3')	位置	サイズ	引用
(CNSV特異的プライマー)				
RNA1 RdRp F	GAATGTTACTATTACTGATGGTAGT	RdRp gene	250bp	丸山作製 (2014)
RNA1 RdRp R	ACATTTAGAGCTAATTCATAGAG			
(内部標準:18S rRNA増幅プライマー)				
18S rRNA_F_399	GAGAAACGGCTACCAC	18S rRNA gene	520bp	遠藤作製 (2014)
18S rRNA_F_901	ATCCAAGAATTTCCACC			

2) 核酸の抽出と RT-PCR (1step)

つまようじ **multiplex RT-PCR** では、**1step RT-PCR** を行った。**PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2** (タカラバイオ社製) を使用した。この方法は、**RNA** の逆転写による **cDNA** の合成と **PCR** を一回の試薬調整で行うことができるため、**2step RT-PCR** と比較して、簡便かつ迅速に **RT-PCR** が完了する。

まず、**PCR チューブ** に下記に示す反応液を調製した。

表 1 3. **1step RT-PCR** に用いた試薬

試薬	使用量	最終濃度
PrimeScript 1 step Enzyme Mix	0.4 μ l	
2 \times 1 step buffer	5 μ l	
Each Primer (5 μ M 18S rRNA+40 μ M CNSV)	0.4 μ l	0.4 μ M
RNase Free water	4.2 μ l	
Total	10 μ l	

実験台の上に、サンプル保存袋から出した状態で、検定を行う植物体の葉や枝を順番に並べた。RNA 操作の清潔なつまようじを右手に持ち、左手でサンプルを抑えながら葉や枝の表面を 5~10 回程度軽く突いた。そのつまようじを、PCR チューブ内に作製した RT-PCR 反応液にそれぞれ浸し、抽出した核酸を反応液に溶解させた。コンタミネーションを防ぐために、PCR チューブの開閉はつまようじを持つ手で行った。また、つまようじを持つ手とサンプルに触れる手は必ず分けることに注意して操作を行った。その後、マイクロ遠心機で約 10 秒間遠心し、反応液をチューブの底に集めた後、PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、以下の条件で反応を行った。

表 1 4. CNSV 特異的プライマーを用いた
つまようじ multiplex RT-PCR の反応条件

温度	時間	
50°C	30min.	
94°C	2min.	
94°C	30sec.	} ×25
50°C	30sec.	
72°C	30sec.	

3. 8. 3 電気泳動

核酸電気泳動槽（ミューピッド社製）に作製したアガロースゲルを置き、ゲルの数ミリ上まで 1×TAE を注いだ。パラフィルム上に、1μl ずつ 6×Loading buffer（タカラバイオ社製）を分注し、そこに 2~3μl の PCR 産物を混合し、サンプル全量をウェルにロードした。端のウェルには、分子量マーカーとして 1% アガロースゲルには λ Hind III digest（タカラバイオ社製）を、2% アガロースゲルには 100bp DNA Ladder（タカラバイオ社製）をそれぞれ 5μl ロードした。120V で約 30 分~60 分間泳動を行った。2 段のアガロースゲルを使用した際には、5mA、120V で約 15 分間泳動を行った。泳動終了後、アガロースゲルをエチジウムブロマイド溶液に浸し、10~15 分程度染色を行った。その後、ゲル撮影装置（アトー社製）を用いた紫外線照射により、PCR 産物の増幅の有無を確認した。適宜、写真撮影を行った。

3. 9 全塩基配列の決定

既報の CNSV ソテツ分離株の全塩基配列 (Accession : NC_003791、NC_003792) (Han, S.S. *et al.*, 2002) からプライマーを作製し、プライマーウォーキングにより本ウイルスの塩基配列を解析した。

3. 9. 1 プライマーの作製

1) CNSV ソテツ分離株の全塩基配列から作製したプライマー

シーケンス解析に用いる鋳型を作製するために、CNSV ソテツ分離株の全塩基配列から、RNA1 は約 3000bp ずつ DNA 断片が増幅されるように Forward と Reverse プライマーを 3 組、計 6 つのプライマーを作製した (表 1 5)。また、RNA2 は 5'末端側に Forward のプライマーを 1 つ設計し、oligo dT – Adaptor Primer を Reverse プライマーにして PCR 反応を行った。

表 1 5. CNSV ソテツ分離株全塩基配列から作製したプライマー

プライマー名	配列 (5'-3')
(RNA1用)	
CNSV_1F	TAATTGATGTCTGGGATAGCGCCCA
CNSV_3005R	TCCACAACACTACGGCTCGCCTATTGT
CNSV_2491F	GCAGGAACGCCTAGACGGTTGAGTT
CNSV_5485R	CACAATTTTATGGCGCGGTCTGATTT
CNSV_5001F	TGGTATCCCAGGAACCTCAGATTGAT
CNSV_7471R	AGGGTTTTTTTGGGTTTTTCTAATACA
(RNA2用)	
CNSV_RNA2_127F	TCTGGGATAGCGCCCAGCAATTTTA

これらのプライマーを用いて RT-PCR (PCR は、*TaKaRa Ex Taq* HS または PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase を使用) を行い、得られた増幅断片をシーケンス解析に使用した。

2) プライマーウォーキングによる塩基配列の解析に使用したプライマー

シーケンス解析により得られた配列の末端から 100~200bp 程内側に 25mer 前後の長さで、GC 含量が極端に偏らないよう留意しながら新たなプライマーを作製した (表 1 6)。そして CNSV ソテツ分離株の全塩基配列から作製したプライマーを用いた RT-PCR により得られた増幅断片を鋳型にして、シーケンス解析を行った。その作業を複数回繰り返して塩基配列の解析を行った。解析した塩基配列とアミノ酸配列は、BLAST 検索により相同性検索を行った。また、他の分離株や他のウイルスとの相同性の比較は、GENETYX ver.10 を使用した。

表 1 6 . プライマーウォーキングによる塩基配列の解析に使用したプライマー

プライマー名	配列 (5'-3')
(RNA1用)	
672F	GCAGCACAGCTGNAGGGCGTACCNA
800F	AAGCAGCCGTCCCCACGAAGAGGC
920F	TGGCTGACCCTGTGTGCAGAGTGCT
1250R	CACCAGATCTGGCCGCTTGCCAGCA
1420R	CTCCAACAATAAGTCCAAGGGCATA
2070R	TCAGCAAGGCGACCAAAGTAATACA
2160F	GATTGGATCAAGCGTTCTAGGGGGG
2334R	TCCATGTAGGCTCCTTACGGCGACC
3440F	TACTATGGCACAGCAGCGACTTTTT
3540R	TCTTTGAATATACATTGCTTTCATC
3700R	TGCACCCCCCATAACACCAATAAAG
3860R	ACATGTCTCGTGGTTGGGGAAC TCC
4430R	GAATGTCTGCCCAGGTTTGTGATC
4460R	GGATACACCAAATTGGGGTATTTGA
4835R	TTTCATACCTGGCTCTTTATGTAAA
5130F	TGCTTAAGGTTGAGAAGGTAAAACA
5391F	GAAGTTATGCGTGTGCGAGCCGGAT
6570R	CTTTGCTGCTTGGCCAAAAGCCATC
6620F	TCTGTACCGCAATGTTATACCCGAA
6816R	GGGCACAACGCATAGCCCAACACTG
6900F	AATTTTTGTCTTGGTCATGCCACAT
7000F	GCACAACGCATAGCCCAACACTGTGAAA
7200F	TTCTATAGCCGTAGGCATCTACAAG
(RNA2用)	
RNA2_890F	CCTGAATTGACCAGTTTTGAGGAT
RNA2_1640F	CGGAAAAAGAAGCGGGAGGTGAGAG
RNA2_2500F	CTATTGAGAAGGGAAATGGAAAAGG
RNA2_3300F	AAGTGGTGATGCAGTTCTCTACTCC
RNA2_3560R	CCAGAGTCACCATATACAGAAGAGG
RNA2_4030F	GGGAACGTTTGCCGGTCCCACTCCC
CNSV_3720F*	CTGTTGAACCGACTACCTCC

*(大嶽, 2012)を使用

3. 9. 2 シーケンス解析

1) PCR 産物の精製

PCR 反応液中に残存する dNTP やプライマーを、酵素処理によって消化した。
PCR 産物 5 μ l に、以下の試薬を混合した。

表 1 7. PCR 産物の精製に使用した試薬

試薬名	使用量 (1sample)
Alkaline Phosphatase	1 μ l (10倍希釈したもの)
Exonuclease I	1 μ l (10倍希釈したもの)

サーマルサイクラーを用いて、以下の条件で反応を行った。

表 1 8. PCR 産物の精製の反応条件

温度	時間
37°C	15min.
80°C	15min.
4°C	∞

2) シーケンス反応

PCR チューブに以下の試薬を調整した。

表 1 9. PCR 産物の精製の反応条件

試薬名	量 (μ l)
Big Dye terminator v3.1	0.5
5 \times sequence buffer	1.75
3.2 μ M primer	0.5
滅菌蒸留水	(3.75)
template DNA *	(3.5)
total	10

※ () 内は template DNA の濃度によって適量を使用し、滅菌蒸留水で total 液量を調整した。

*使用する Template DNA の量は、以下の表を参考にした。

表 2 0. PCR 産物の精製の反応条件

template DNAの長さ	量
PCR Products 100-200bp	1-3ng
PCR Products 200-500bp	3-10ng
PCR Products 500-1000bp	5-20ng
PCR Products 1000-2000bp	10-40ng
PCR Products >2000bp	20-50ng

試薬を調整後、サーマルサイクラーを用いて以下の条件で反応を行った。

表 2 1. シーケンスの反応条件

温度	時間	
96°C	3min.	
96°C	15sec.] ×25
50°C	5sec.	
60°C	4min.	
4°C	∞	

3) エタノール沈殿

1.5ml チューブに以下の試薬を調整した。

表 2 2. エタノール沈殿に使用した試薬

試薬名	量 (μl)
シーケンス反応産物	10
99%エタノール	25
3M 酢酸ナトリウム	1

これらを調整後、転倒混和し、15,000rpm 30 分間 4°Cで遠心を行った。遠心後、マイクロピペットで上清を取り除き、そこに 70%エタノールを 50 μl 加えた。その後、15,000rpm 10 分間 4°Cで遠心を行い、同様に上清を取り除いた後、真空乾燥機で約 20 分間風乾した。完全に風乾ができたことを確認した後、ホルム

アミドを 15 μ l 加え、よく溶解した。シーケンス用の 96 穴プレートに移し変え、サーマルサイクラーで 95°C 4 分間熱処理をした。

4) シーケンサー

ABI3130xl ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems 社製) で解析を行った。得られた配列は、ATGC で解析し、NCBI の BLAST で相同性検索を行った。

3. 1 0 系統解析

GENETYX ver.10 で UPGMA 法を用いて系統樹を作製した。作製の際に使用した他のウイルスについては、2002 年の Han らの報告の系統解析で用いられていた *Nepovirus* 属のウイルスを参考にして、以下のウイルスを選択した。*Tomato ringspot virus* (NC_003839) *Black currant reversion virus* (NC_003502) *Raspberry ringspot virus* (NC_005267) *Tobacco ringspot virus* (NC_005096) *Arabis mosaic virus* (GQ369530) *Grapevine fanleaf virus* (NC_003623) *Grapevine chrome mosaic virus* (NC_003621) *Beet ringspot virus* (NC_003694) *Tomato black ring virus* (NC_004440) CNSV ソテツ分離株 (NC_003792) CNSV ユリ分離株 (JN127337) CNSV ジンチョウゲ分離株 (大嶽, 2012) CNSV グラジオラス分離株 (AB237656) の 10 種の *Nepovirus* 属ウイルスである。塩基配列については NCBI の GenBank に登録されているものを使用した。

3. 1 1 線虫伝染試験

1) 供試線虫と飼育方法

本試験には、横浜植物防疫所から分譲していただいたキイチゴオオハリセンチュウ (*Xiphinema bakeri*) を使用した (図 9)。飼育方法は、直径約 11.5cm、深さ約 8cm のプラスチックポットに、挿し木で増殖したクワを、黒木：赤玉：培養土：パーライト＝5：2：2：1 を混合した土壌に植え、そこに線虫を放飼した。ポットは、約 25℃の温室内に置いた。灌水が過剰になると線虫が酸欠になり溺れてしまうことから、土壌の表面が少し乾いたときにだけ、約 50ml～100ml 程度の水道水を灌水した。ただし休日については、温室の自動灌水で灌水を行った。



図 9. キイチゴオオハリセンチュウ

2) 線虫伝染試験の方法

1983 年に Trudgill らが報告した線虫伝染試験の基準に基づいて、接種試験を行った。基準は以下の 3 つである。

- (1) そのウイルスによって餌植物が全身感染していることを示すこと。
- (2) ハンドピックで選別した線虫を供試すること、また、その線虫が確実にベクターであることを示すためのコントロールを置くこと。
- (3) それぞれの試験の開始と終了時に供試線虫とウイルスの分離株を同定すること。

これらを基に、以下の試験方法で試験を行った。

① ふるい分けベルマン法による土壌からの線虫の分離

オオハリセンチュウは他の植物寄生性線虫と比べて体長が長く、運動性がそれほど高くないため、ベルマン法だけでは分離が困難とされていることから、ふるい分けベルマン法を用いて分離を行った。

まず、3 リットルのポリビーカーに、線虫土壌約 300g を入れ、水道水をいっぱい満たして攪拌し、その後 1 時間程度静置して根についている線虫を水中に浮かせた。その後の作業は、土が流れても問題のない作業用の水道で行った。ふるい分けには、直径 20cm、深さ 6cm の 30 メッシュ ($500\mu\text{m}$) と 280 メッシュ ($53\mu\text{m}$) の試験用ふるい (アズワン社製) を使用した。目の細かい 280 メッシュのふるいを下にして重ね、白バットの上で水を流して準備をした。1 時間程度静置した線虫土壌水を、葉さじ等で勢いよく攪拌し、約 30 秒後、上層のにごりが引いてきた頃に (上層の水に線虫が浮いている状態)、下に沈殿した土壌を流し込まないように気を付けながら、ふるいに流し入れた (図 10)。その後、上から軽くシャワーを数回かけて、ふるいを揺すりながら土壌を洗い流した。この作業を計 3 回程度行い、最後に、下のふるいに残った土壌を、ふるいの裏から洗瓶で水をかけながらビーカーに移した。



図 10. ふるい分け法による線虫分離の様子

ふるい分け後、その線虫土壤水を使ってベルマン法を行った（図 1 1）。漏斗に適量の水を張り、その上に、十字に重ねた 2 枚のキムワイプを敷いた。葉さじ等に沿わせるように、上からゆっくり線虫土壤水を流し入れた。そのまま 2 日間程度静置して分離を行った。



図 1 1．ベルマン法による線虫分離の様子

② 簡易形態同定とハンドピックによる線虫の選別

光学顕微鏡（ZEISS 社製）を用いて、ふるい分けベルマン法で分離した線虫の簡易形態同定を行った。簡易形態同定で確認した部位は、①体形②歯針担基部の形態③尾部の形態④陰門の位置である（図 1 2）。オオハリセンチュウの体形は、J～C 字型で、口針の歯針担基部が錯状に強い膨らみがあることが特徴である。また、キイチゴオオハリセンチュウは、尾部の先端が短い円錐形で尾端部に指状突起があること、頭部から陰門（V 値）が 29～40%の位置にあることが主な特徴となっている。（平田，2004）これらの特徴は、成虫で観察可能である。幼虫の見分け方としては、口針の後ろに脱皮の際に生えかわる新たな口針が観察され、また体内の脂肪分が多く全体的に黒く靄がかかっているような状態で、陰門がうまく観察できない。これらの特徴を判断し、簡易形態同定においてキイチゴオオハリセンチュウと認められた個体を、線虫針で一頭ずつハンドピックを行い選別した。試験には成虫を優先的に選別し、約 180 頭（30 頭×（接種試験 3 区分+ウイルス保持検定 2 区分））のキイチゴオオハリセンチュウを使用した。

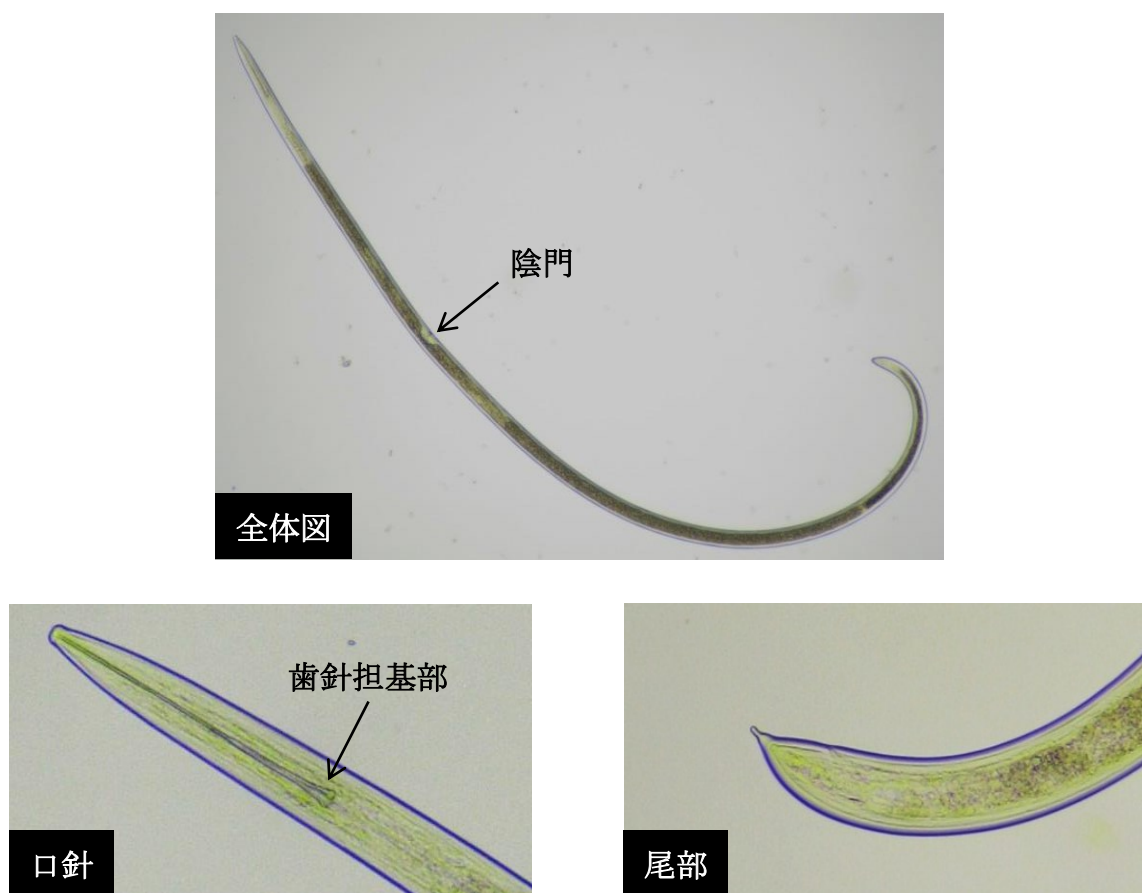


図 1 2．キイチゴオオハリセンチュウの形態的特徴

③ 接種試験

接種区を 1 区と対照区を 3 区（熱処理区・無接種区・無線虫区）置き、それぞれ直径約 11.5cm、深さ約 8cm のプラスチックポットのプラスチックポットで各区一鉢ずつ試験を行った（図 1 3）。線虫は 1 区につき 30 頭ずつ使用し、接種源には本ウイルス感染 *C. quinoa* を、検定植物には *Petunia × hybrida* を使用した。接種試験を行う前に、接種源の *C. quinoa* が本ウイルスに感染していること、また、根までウイルスが移行しているかどうか確認するために RT-PCR 検定を行った。土壌は、オートクレーブで熱処理をした滅菌土壌を使用し、試験中の実験植物は温室内で管理した。

接種区：滅菌土壌に本ウイルスに感染した *C. quinoa* を移植し、そこに分離・形態同定を行った線虫を放飼した。2 週間後、接種源の *C. quinoa* を取り除き、その線虫汚染土壌に健全の *Petunia × hybrida* を移植した。6 週間後、検定植物の根と葉それぞれの tm RT-PCR 検定を行い、本ウイルスの感染の有無を確認した。

熱処理区：線虫以外のベクターがないことを確認するために行った。接種区と同様に接種源に線虫を 2 週間放飼し、その後、接種源の *C. quinoa* を取り除いた。その線虫汚染土壌をオートクレーブにかけて線虫を熱殺した。その土壌に健全の *Petunia × hybrida* を移植し、6 週間後根と葉の tm RT-PCR 検定を行った。

無接種区：供試した線虫がウイルスフリーであることを確認するために行った。滅菌土壌に、健全の *Petunia × hybrida* を移植し、6 週間後、根と葉の tm RT-PCR 検定を行った。

無線虫区：土壌中の接種源の根の残渣によって、検定植物が接触伝染しないかどうか確認するために行った。本ウイルスに感染した *C. quinoa* を 2 週間栽培した。その後感染 *C. quinoa* を取り除いた土壌に、健全の *Petunia × hybrida* を移植し、6 週間後、根と葉の tm RT-PCR 検定を行った。

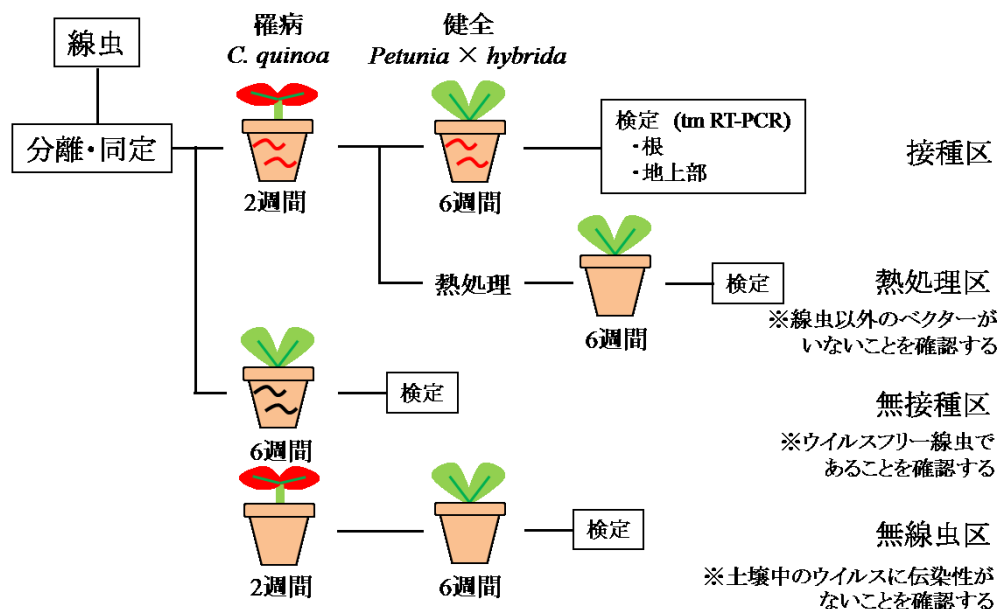


図 1 3. 線虫伝染試験の方法

3) 検定方法

◆検定植物のウイルス検定

各区は最後に、検定植物の根と葉を本ウイルス特異的プライマーを用いた tm RT-PCR 検定を行い感染の有無を確認した。

◆接種源に放飼した線虫のウイルス保持検定

接種源に放飼した線虫がウイルスを獲得しているかどうか確認するために、Nested RT-PCR によるウイルス保持検定を行った。接種区と同様に接種源に放飼して 2 週間後の線虫を、ふるい分けベルマン法で分離し、光学顕微鏡で観察しながら 1.5ml チューブ (2 本) に 10 頭ずつ移した。また、対照区として、分離・同定した接種区に放飼していない線虫を 1.5ml チューブ (2 本) に 10 頭ずつ移した。

線虫からの核酸の抽出には、TRIzol® (ライフテクノロジーズジャパン社製) を使用した。線虫を回収したそれぞれのチューブに、TRIzol® を 200 μ l、クロロホルムを 75 μ l ずつ加え、マルチビーズショッカーで破砕した。そのチューブを 15,000rpm 15 分間 4°C で遠心し、下層を取らないようにしながら上層だけを新しい RNA 用 1.5 μ l チューブに回収した。そこに、イソプロパノールを 75 μ l、グリコーゲンを 1 μ l 加え、良く攪拌し、15,000rpm 15 分間 4°C で遠心し、底に沈殿したペレットに触れないように上清を捨てた。そのチューブに 70% エタノールを 300 μ l 加えて良く攪拌し、15,000rpm 15 分間 4°C で遠心後、上清を捨てて、完全に風乾させた。風乾後、10 μ l の RNase Free Water で溶解した。

線虫から抽出した核酸を用いて、tm RT-PCR で使用した CNSV 特異的プライマー (表 1 3) を用いて RT-PCR を行った。その後、その PCR 産物を蒸留水で 10 倍に希釈し、それを鋳型として Nested RT-PCR 用に作製したプライマーを用いて RT-PCR を行った。Nested RT-PCR 用のプライマーは、プライマー設計支援用ソフトウェア Primer3 を使用して、CNSV 特異的プライマーの増幅位置の 20 ~ 50bp 内側に、Tm 値が 61 ~ 63°C 程度で 24mer の長さのプライマーを作製した。(表 2 3)。

表 2 3. Nested RT-PCR で使用したプライマー

プライマー名	配列 (5'-3')	位置	サイズ
CNSV_Nested F	CTGATATTAAGTGGGAAGGCTCCTG	RdRp gene	約180bp
CNSV_Nested R	GTATCCACATTTTCAACCTGAAGT		

3. 1 2 戻し接種

コッホの原則を満たすため、ウメ実生への戻し接種と原病徴の再現を試みた。戻し接種は、接ぎ木あるいは汁液接種で行った（表 2 4）。接ぎ木接種では、本ウイルスを分離した‘日光梅’の苗木を穂木とし、ウメ実生を台木として芽接ぎ 36 本、腹接ぎ 10 本、葉柄接ぎ 37 本に接種を行った。汁液接種では 2 種類の方法で接種を行った。一つ目は、接種後約 10 日～14 日の退緑斑点の病徴をよく呈している本ウイルス感染 *C. quinoa* 葉を 0.1M リン酸緩衝液で磨砕したものを接種源とし、75 本の発芽寸前の実生の双葉を割り、中の新芽に接種を行った。二つ目は、部分純化試料を接種源とし、発芽した実生を播種後約 1 週間程度の若いウメ実生苗 75 本に接種を行った。汁液接種はいずれもカーボランダムを用いて接種を行った。検定は、接種約 1 か月後に *C. quinoa* への汁液接種や tm RT-PCR を用いて行った。

表 2 4. 戻し接種の方法とウメ実生の接種本数

		接種本数
(接木方法)		
接木接種	芽接ぎ	36
	腹接ぎ	10
	葉柄接ぎ	37
(接種源)		
汁液接種	感染 <i>C. quinoa</i> 粗汁液	70
	部分純化試料	75

3. 1 3 錦性と本ウイルスとの関係性の調査

(1) 各地‘日光梅’の本ウイルス感染状況調査

2011年に購入した‘日光梅’の苗木に加えて、2014年に新たに3株の‘日光梅’の苗木を同じ業者から購入した。この苗木も2011年に購入した‘日光梅’と同様に、購入当初は枝がまだらに黄化する錦性は見られなかったが、2014年秋には、錦性が観察されるようになった。また、同年5月に神奈川県、7月に大阪府、8月に三重県において3株の‘日光梅’の葉を採取した。これらの株はいずれも枝に錦性が観察された。また、葉には葉脈黄化症状が観察され、三重株と大阪株については葉の縁が白～黄色になる症状が見られた。これら計8株の‘日光梅’の葉を、tm RT-PCRで検定した。



図1 4. 各地‘日光梅’の葉の症状（左から神奈川株、大阪株、三重株）

(2) 各種ウメ品種の本ウイルス感染状況調査

2014年10月～11月に東京都や神奈川県の公園で、錦性を示すウメ‘埤出錦’‘錦性埤出の鷹’‘埤出の鷹’‘東錦’の4品種を含む計9品種のウメを採取した。採取した錦性品種の枝には、すべての品種で錦性の症状が観察された（図2～5）。採取した時期にはすでに落葉が進んでいたが、‘埤出錦’‘錦性埤出の鷹’‘埤出の鷹’で図1 4の大阪株のように葉の縁が白～黄色になる症状が観察された。これらに加え、2011年に購入した41品種のウメ苗木を含めた計50品種53検体の葉や枝のtm RT-PCR検定を行い、本ウイルスの感染状況調査を行った（表2、3）。

第四章 結果1 - 本ウイルスの同定と特徴 -

4. 1 宿主範囲調査

12科24属32種の検定植物に汁液接種を行ったところ、アカザ科やナス科などを中心に5科8属13種に感染が確認された(表25)。

表25. 宿主範囲調査結果

科名	種名	和名	病徴 (接種葉/上位葉)	戻し接種
Chenopodiaceae (アカザ科)	<i>Chenopodium quinoa</i>	キノア	CS/CS, N, D	+
	<i>C. foetidum</i>		-/St	+
	<i>C. amaranticolor</i>		CS/CS	+
	<i>C. murale</i>		-/CS	+
	<i>Spinacia oleracea</i> L.	ホウレンソウ	-/St	+
Solanaceae (ナス科)	<i>Capsicum annuum</i> L. Grossum group	ピーマン	-/-	-
	<i>Lycopersicon esculentum</i> 'Odoriko'	トマト	-/-	-
	'Momotaro'		-/-	-
	<i>Nicotiana occidentalis</i>		CRS(3日後に消失)/St	+
	<i>N. benthamiana</i>		R/-	+
	<i>N. tabacum</i> 'White Burley'		-/VC(2日後に消失)	+
	<i>N. tabacum</i> 'Xanthi-NC'		-/VB	+
	<i>N. tabacum</i> 'Samsun'		-/-	-
	<i>N. tabacum</i> 'Samsun-NN'		-/-	-
	<i>N. tabacum</i> 'Bright Yellow'		-/-	-
	<i>N. rustica</i>		-/-	-
	<i>Petunia</i> × <i>hybrida</i>	ツクバネアサガオ	-/CS	+
Asteraceae (キク科)	<i>Physalis floridana</i>		-/-	-
	<i>Xanthophthalmum coronarium</i> 'Tokinashi-gosun'	シュンギク	-/-	-
Leguminosae (マメ科)	<i>Tagetes</i> sp.		-/-	-
	<i>Glycine max</i> 'Tsurunoko-daizu'	ダイズ	-/-	-
	'shiratori-edamame'	エダマメ	-/-	-
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	インゲンマメ	-/-	-
	<i>Pisum sativum</i>	エンドウ	-/-	-
Aizoonaceae (ハマミズナ科)	<i>Vicia faba</i>	ソラマメ	-/-	-
	<i>Tetragonia expansa</i>	ツルナ	RS/RS	+
Cucurbitaceae (ウリ科)	<i>Cucumis sativus</i>	キュウリ	-/-	-
	<i>Cucurbita maxima</i> 'Butter cup'	カボチャ	-/-	-
Amaranthaceae (ヒユ科)	<i>Celosia cristata</i>	ケイトウ	-/-	+
	<i>Gomphrena globosa</i>	センニチコウ	-/-	+
Caryophyllaceae (ナデシコ科)	<i>Dianthus</i> sp.		-/-	-
Brassicaceae (アブラナ科)	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i>	ブロッコリー	-/-	-
	<i>Brassica rapa</i> L. var. <i>perviridis</i> 'hamami-2go'	コマツナ	-/-	-
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> 'fujiwase'	キャベツ	-/-	-
	<i>Raphanus sativus</i> var. <i>longipinnatus</i> 'kenka37go'	ダイコン	-/-	-
Apiaceae (セリ科)	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>Sativus</i>	ニンジン	-/-	-
Polygonaceae (タデ科)	<i>Fagopyrum esculentum</i>	ソバ	-/-	-
Alliaceae (ネギ科)	<i>Allium fistulosum</i>	ネギ	-/-	+

CS: 退緑斑点, RS: 輪紋, NS: えそ斑点, N: えそ, CRS: 退緑輪紋, VC: 葉脈透過, D: 奇形, M: モザイク, St: 生育阻害, M: モットル, -: 無病徴

※一部(丸山, 2013)より引用



図 1 4 . *C. quinoa* に見られた退緑斑点、
えそ、奇形の症状（接種後約 2 週間）



図 1 5 . *N. tabacum* 'White burley'
に見られた葉脈透過症状
（2 日後に消失）
（接種後約 1 週間）



図 1 6 . *Tetragonia expansa*
に見られた輪紋症状
（接種後約 2 週間）

4. 2 物理学の性質

本ウイルスの物理学の性質は、耐熱性 65～70℃、耐希釈性 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ 、耐保存性 78～89 日であった（表 2 6）。本ウイルスの物理学の性質は、他の核果類に感染するウイルスと比べて特に耐保存性が比較的長く、比較的安定性の高いウイルスであることが分かった（表 2 7）。

表 2 6. 物理学の性質試験結果

試験名	結果
耐熱性	65～70℃
耐希釈性	$10^{-3} \sim 10^{-4}$
耐保存性	78～89 日

（丸山, 2012）

表 2 7. 核果類に感染するウイルスとの物理学の性質の比較

ウイルス名	属	耐希釈性	耐熱性 (10分間)	耐保存性 (20℃)
本ウイルス		$10^3 \sim 10^4$	65～70℃	78～89 日
<i>Arabis mosaic virus</i>	<i>Nepovirus</i> (A)	$10^3 \sim 10^5$	55～61℃	7～14 日
<i>Cycas necrotic stunt virus</i> *	<i>Nepovirus</i> (B)	$10^3 \sim 5 \times 10^3$	60～65℃	18～24 日
<i>Cherry leaf roll virus</i>	<i>Nepovirus</i> (C)	$10^3 \sim 10^5$	52～55℃	5～10 日
<i>Strawberry latent ringspot virus</i>	<i>Sadwavirus</i>	$10^3 \sim 10^5$	52～58℃	50 日以上
<i>Cucumber mosaic virus</i>	<i>Cucumovirus</i>	10^4	70℃	数日
<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>	<i>Ilarvirus</i>	—	55～62℃	9～18 時間
<i>Apple stem grooving virus</i>	<i>Capillovirus</i>	10^4	60～63℃	2 日

引用：Discription of Plant Viruses

* (Hanada *et al.*, 1986)

4. 3 部分純化とウイルス粒子の形態

10-40%ショ糖密度勾配遠心を行ったところ、図17に示したように、2本のバンドが確認された。このバンドをそれぞれ回収し、再度超遠心を行った部分純化試料を電子顕微鏡観察したところ、下のバンドの試料から直径約25nmの球状粒子が観察された（図18）。

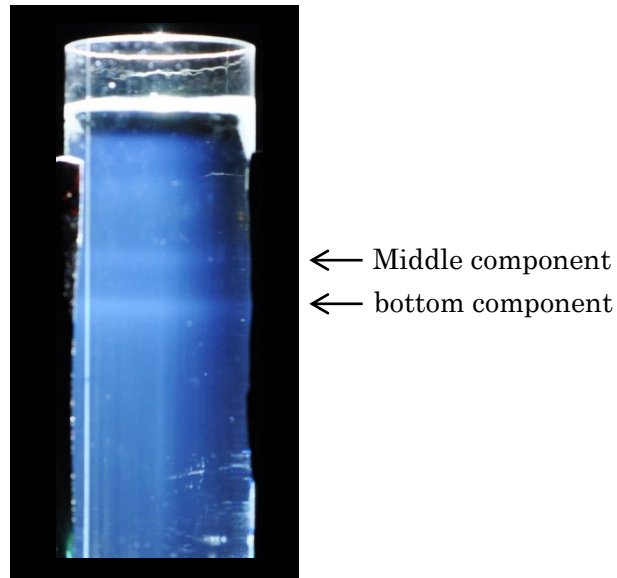


図17. ショ糖密度勾配遠心で確認された2本のバンド

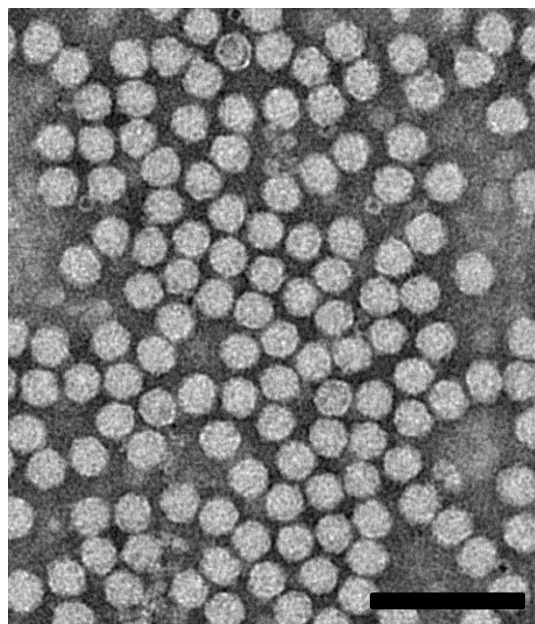


図18. 部分純化試料で観察された球状粒子

※Barは100nm

4. 4 核酸の特徴

部分純化試料から核酸を抽出し、2.2M ホルムアルデヒド-1.0%アガロースゲルで電気泳動を行ったところ、約 6000nt と約 4800nt の 2 本のバンドが確認された（図 1 9）。このことから本ウイルスは、2 分節の RNA を持つウイルスであることが考えられた。

RNA の電気泳動では PCR を行わないため、高濃度の RNA を抽出できることが重要である。いくつか試みた方法の中では、今回行った 1983 年の佐藤らの方法（図 8）が最も良く RNA を抽出できる方法であった。

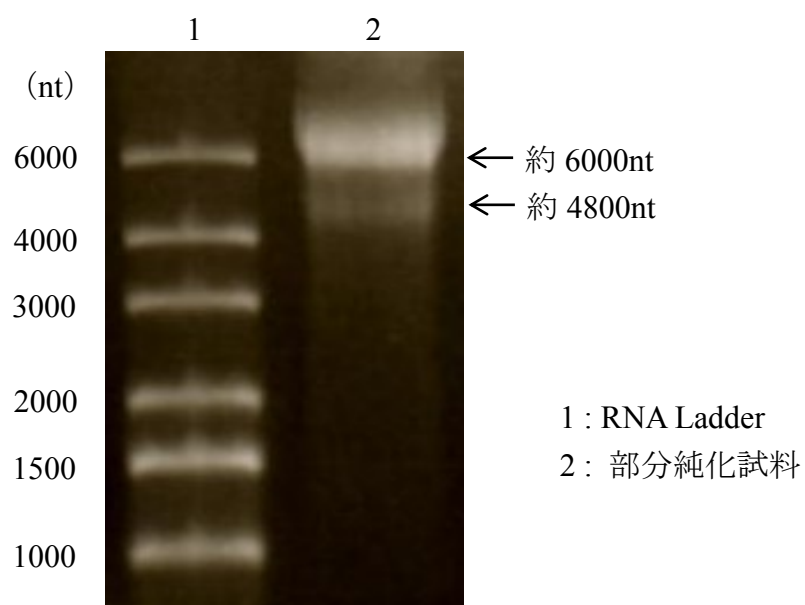


図 1 9. 部分純化試料から抽出した RNA

4. 5 外被タンパク質の特徴

(1) SDS-PAGE・CBB 染色

部分純化試料を用いて、SDS-PAGE と CBB 染色を行った。対照区として、健全の *C. quinoa* 葉を同時に泳動した。その結果、部分純化試料に、約 65kDa と約 58kDa の特異的な 2 本のバンドが確認された (図 2 0)。

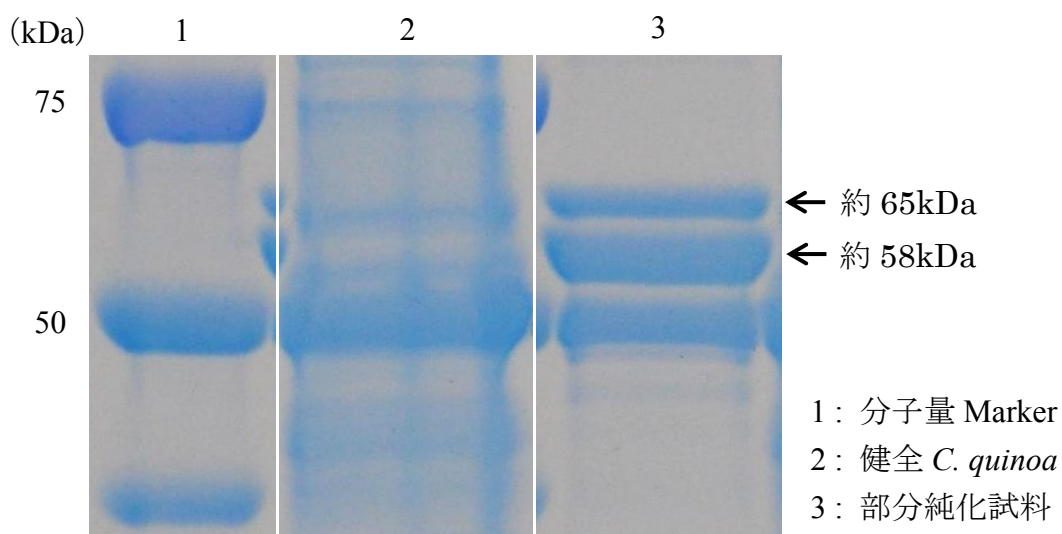


図 2 0. 部分純化試料の SDS-PAGE・CBB 染色

(2) MALDI-TOFMS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法)

SDS-PAGE・CBB 染色で確認された特異的な 2 本のバンドを、それぞれ MALDI-TOFMS 解析を行った。解析の結果、いずれも *Nepovirus* 属の一種である *Cycas necrotic stunt virus* (CNSV) の外被タンパク質に類似していることが分かった。いずれのタンパク質も、CNSV ソテツ分離株の外被タンパク質と類似していたが、約 58kDa のタンパク質の C 末端側が、5 アミノ酸程度短くなっていた。(図 2 1, 図 2 2)

```

1  SENAGHSVGD MKSAENFVFT QLITMPAAST KGNVLAGVDI LANARTTMSG
51  FYMRWLQKGY VDTNLK LICH LPRAPPAGIS FFVLIDGTGY LAKDAPTSLN
101 EEEILSYPLH LVTTSDVSSY EFVLDWHRYI GQVPFAEENA FLRPTLFLVA
151 CVSSTLALSA KVEFYLEAQS VGEELPRTLA PSPVLSYPPQ NSFLEDLDF
201 LPPKRLTLGE RETTIIPLSF AKSKKSGDAV LYSHAAAR LA HFQGIGGVLEH
251 GVVYLVGSQ L VASKI HISMW SKEQHVQHQA MNVHVDITDG VAFDLPIKDA
301 FYASSVYGDS GAVIQITCLC SPMSPNAIKA PFDMVFKIKG FTPDAPMCR T
351 INFTQRFGWF AVEPTTSTGA IKLKIWPVSN HLESEDMKVT GYTNAFLQMC
401 QTSTMHFGSV IIHFSWTLFG GTTNAATAGG VVTIAEGFGP EEENFRGHCR
451 NFSIYEGKAT VPLELGTFAG PTPLKKLDFK YRNWIRFTTP KGRNISSIFC
501 AIEVLPGF SF YGRTGSPRLS VAGTTVPPVA DASTSNSQSG DEDIGDQCAA
551 ALGRGRGRGS RPGPNPIRG

```

図 2 1. 上のバンド (約 65kDa) と CNSV ソテツ分離株との
アミノ酸配列の相同部分

```

1  SENAGHSVGD MKSAENFVFT QLITMPAAST KGNVLAGVDI LANARTTMSG
51  FYMRWLQKGY VDTNLK LICH LPRAPPAGIS FFVLIDGTGY LAKDAPTSLN
101 EEEILSYPLH LVTTSDVSSY EFVLDWHRYI GQVPFAEENA FLRPTLFLVA
151 CVSSTLALSA KVEFYLEAQS VGEELPRTLA PSPVLSYPPQ NSFLEDLDF
201 LPPKRLTLGE RETTIIPLSF AKSKKSGDAV LYSHAAAR LA HFQGIGGVLEH
251 GVVYLVGSQ L VASKI HISMW SKEQHVQHQA MNVHVDITDG VAFDLPIKDA
301 FYASSVYGDS GAVIQITCLC SPMSPNAIKA PFDMVFKIKG FTPDAPMCR T
351 INFTQRFGWF AVEPTTSTGA IKLKIWPVSN HLESEDMKVT GYTNAFLQMC
401 QTSTMHFGSV IIHFSWTLFG GTTNAATAGG VVTIAEGFGP EEENFRGHCR
451 NFSIYEGKAT VPLELGTFAG PTPLKKLDFK YRNWIRFTTP KGRNISSIFC
501 AIEVLPGF SF YGRTGSPRLS VAGTTVPPVA DASTSNSQSG DEDIGDQCAA
551 ALGRGRGRGS RPGPNPIRG

```

図 2 2. 下のバンド (約 58kDa) と CNSV ソテツ分離株との
アミノ酸配列の相同部分

※ CNSV ソテツ分離株のアミノ酸配列と一致している部分

4. 6 *Nepovirus* 属 Subgroup 特異的プライマーを用いた RT-PCR

Cycas necrotic stunt virus は *Nepovirus* 属 Subgroup B のウイルスであることから、Subgroup 特異的プライマーを用いた RT-PCR により、Subgroup の特定を行った。ポジティブコントロールとして、Subgroup A は *Arabidopsis mosaic virus* 感染 *C. quinoa*、Subgroup B は *Cycas necrotic stunt virus* のジンチョウゲ分離株を使用した。Subgroup B のプライマーを用いた罹病サンプルで、約 220bp の位置に目的の増幅バンドが確認されたことから、本ウイルスが *Nepovirus* 属 Subgroup B のウイルスであることが確認された (図 2 3)。

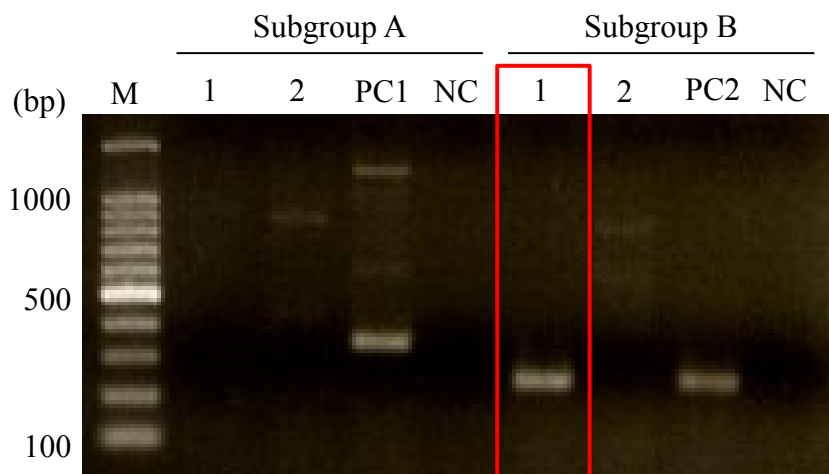


図 2 3. Subgroup 特異的プライマーを用いた RT-PCR

M : 100bp ladder 1 : り病 *C. quinoa* 2 : 健全 *C. quinoa*

PC1: *Arabidopsis mosaic virus* (positive control)

PC2 : *Cycas necrotic stunt virus* (ジンチョウゲ分離株) (positive control)

NC : negative control

4. 7 塩基配列の解析

CNSV ソテツ分離株 (CNSV-C) の全塩基配列からプライマーを作製し、プライマーウォーキングにより塩基配列を解析した。CNSV-C の RNA1 の塩基配列から作製した 3 組のプライマー (表 1 6) を用いて RT-PCR を行ったところ、いずれも目的の位置に増幅バンドが確認された (図 2 4)。また、RNA2 も同様に、作製したプライマー (図 1 6) と oligo dT Adaptor Primer を使用した RT-PCR により、いずれも目的の位置に増幅バンドが確認された (図 2 5)。これらの増幅産物を鋳型にしてシーケンス解析を行った。

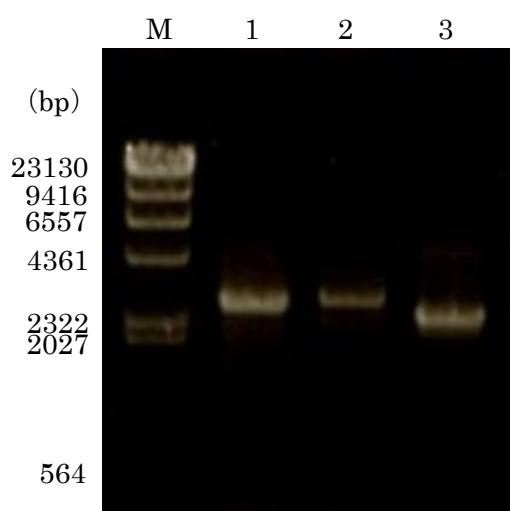


図 2 4. RNA1 の RT-PCR

M : λ Hind III Marker

1 : CNSV_1F \times CNSV_3005R

2 : CNSV_2491F \times CNSV_5485R

3 : CNSV_5001F \times CNSV_7471R

(プライマー名を記載した)

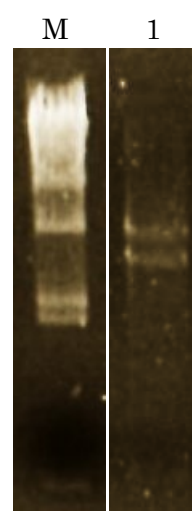


図 2 5. RNA2 の RT-PCR

M : λ Hind III

1 : CNSV_RNA2_127F \times

oligo dT Adaptor Primer

(プライマー名を記載した)

全塩基配列が決定されている CNSV ソテツ分離株 (CNSV-C) は、RNA1 が 7471nt、RNA2 が 4667nt である。本ウイルスの塩基配列は、RNA1 が 7213nt、RNA2 が 4019nt の解析が終了している (図 2 6、図 2 7)。また、本ウイルスと CNSV-C のゲノム構造を図 2 7 に示した。

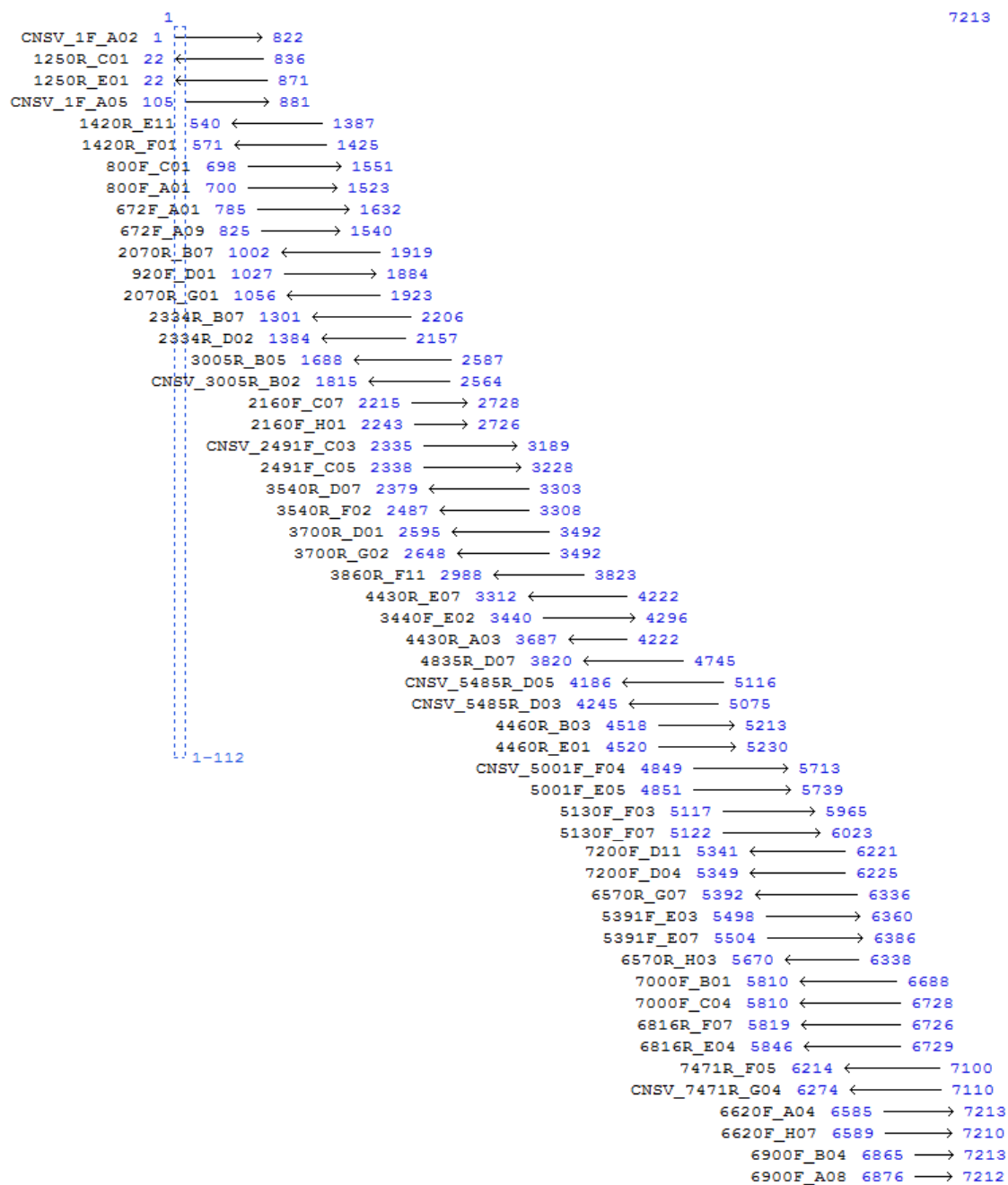


図 2 6. RNA1 の解析に使用したプライマーと解析済みの塩基配列

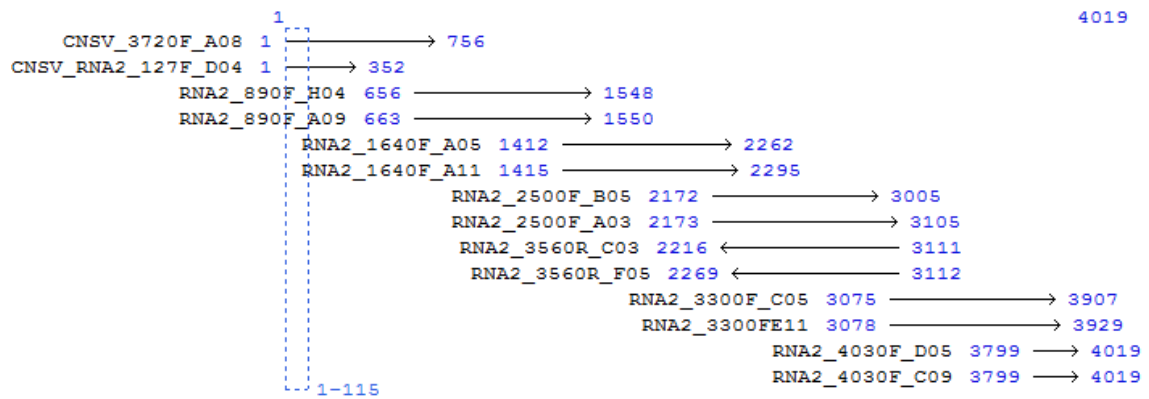


図 2 7. RNA2 の解析に使用したプライマーと解析済みの塩基配列

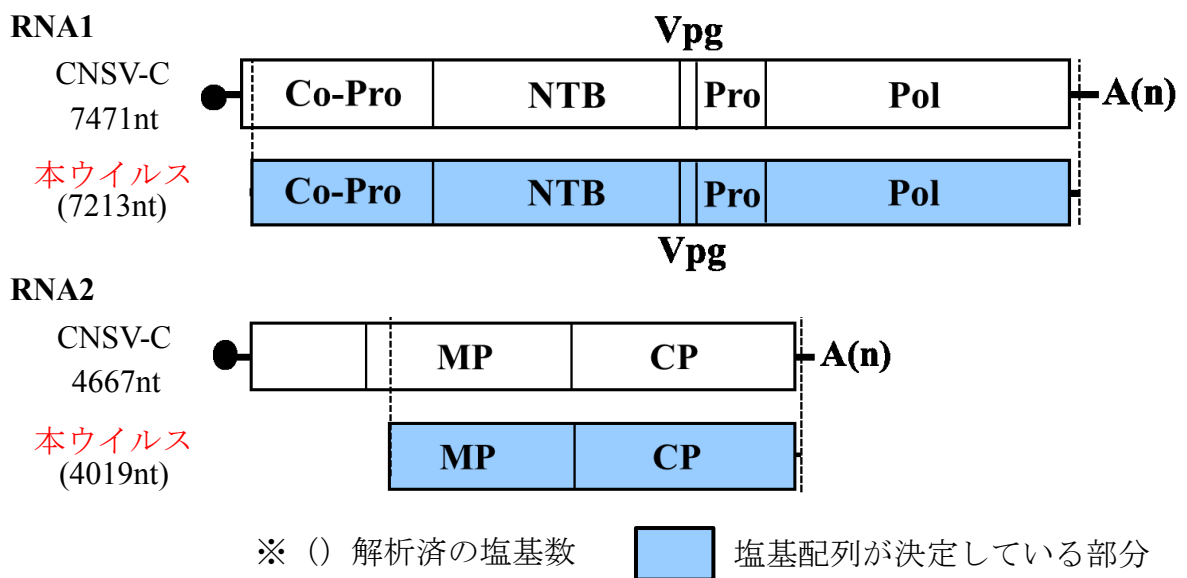


図 2 8. 本ウイルスと CNSV-C のゲノム構造と解析済塩基数

本ウイルスの RNA1 と RNA2 の塩基配列、アミノ酸配列と、CNSV の各分離株と他の *Nepovirus* 属ウイルスとの相同性を比較した。*Nepovirus* 属ウイルスでは、アミノ酸配列における相同性が Pro-Pol 保存領域で 80%以下、CP 領域で 75%以下なら別種とする、という分類基準がある。本ウイルスの Pro-Pol 保存領域では、CNSV 各分離株に対する塩基配列は 88%以上の相同性があり、他のウイルスは 57%以下の低い値を示した。また、アミノ酸配列は 94%以上の相同性があり、他のウイルスは 51%以下の低い値を示した。(表 2 8) CP 領域では、CNSV 各分離株に対して塩基配列は 88%以上の相同性があり、他のウイルスは 50%以下の低い値を示した。また、アミノ酸配列では 94%以上の相同性があり、他のウイルスは 33%以下の低い値を示した(表 2 9)。本ウイルスは、いずれの領域も CNSV 各分離株と高い相同性を示すことが確認された。

表 2 8. RNA1 の塩基配列、アミノ酸配列の相同性の比較

	CNSV-C	CNSV-L	CNSV-D	BRSV	GCMV	TRSV	ToRSV
Co-Pro*	74(81)	89(97)	74(87)	48(29)	49(30)	45(26)	44(18)
NTB	90(95)	89(97)	87(96)	54(44)	55(43)	48(35)	48(26)
Vpg	95(100)	78(100)	92(100)	54(62)	55(60)	50(40)	60(35)
Pro	91(96)	89(98)	91(99)	52(44)	55(46)	46(24)	45(24)
Pol	88(93)	88(95)	88(94)	58(52)	55(49)	48(33)	48(38)
Pro-Pol	89(94)	88(96)	89(95)	57(51)	55(49)	48(30)	47(34)

表 2 9. RNA2 の塩基配列、アミノ酸配列の相同性の比較

	CNSV-C	CNSV-L	CNSV-D	CNSV-G	BRSV	GCMV	TRSV	ToRSV
MP*	86(90)	86(91)	88(92)	—	53(57)	54(45)	44(30)	43(18)
CP	89(95)	88(94)	90(95)	90(97)	49(33)	50(33)	45(20)	44(20)

塩基配列の相同性（アミノ酸配列の相同性）（%）を示す

* 本ウイルスの部分配列と比較

CNSV-C：ソテツ分離株 CNSV-L：ユリ分離株

CNSV-D：ジンチョウゲ分離株 CNSV-G：グラジオラス分離株

(Subgroup A) TRSV：*Tobacco ringspot virus*

(Subgroup B) BRSV：*Beet ringspot virus* GCMV：*Grapevine chrome mosaic virus*

(Subgroup C) ToRSV：*Tomato ringspot virus*

4. 8 系統解析

Coat protein 領域のアミノ酸配列に基づき、系統樹を作製した。本ウイルスは、CNSV 各分離株と同一のクラスターを形成することが確認された (図 2 9)。

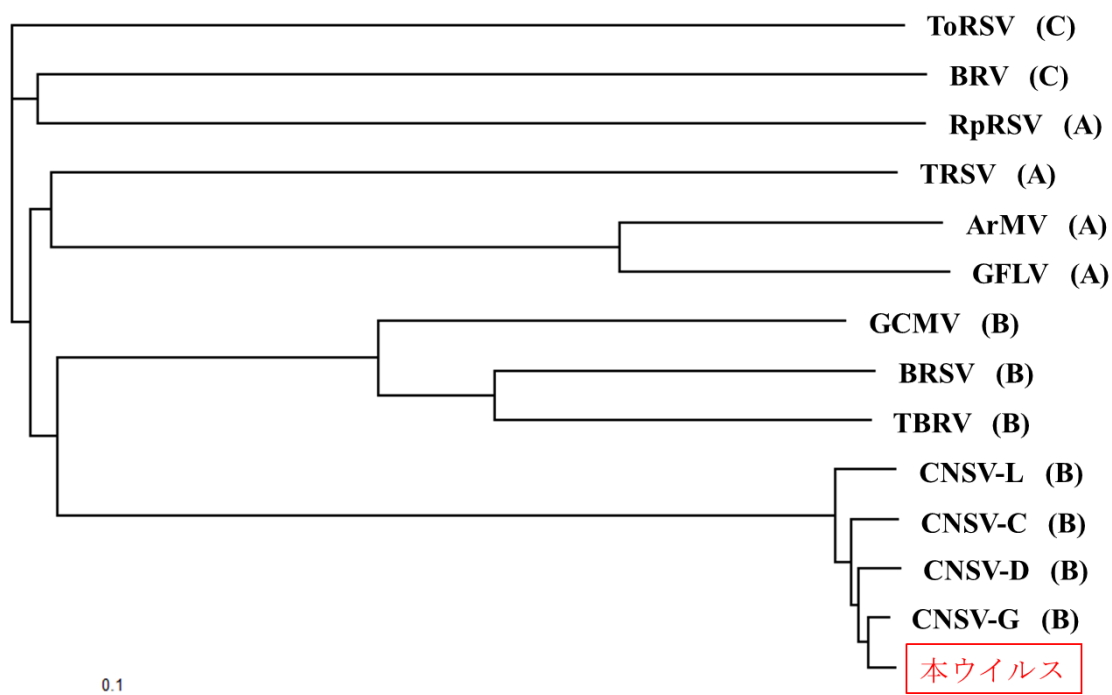


図 2 9. CP のアミノ酸配列に基づく系統樹

※ () 内は Subgroup を示す

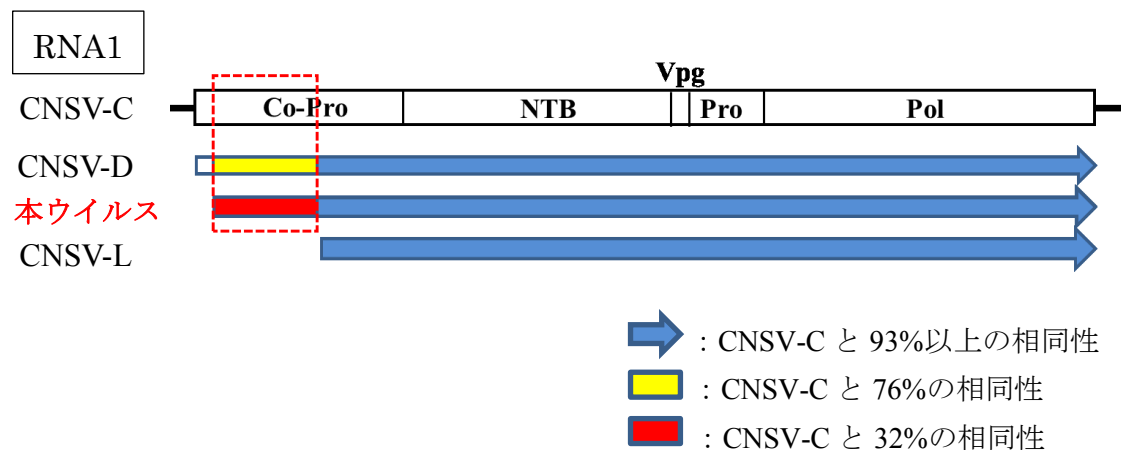
ToRSV : *Tomato ringspot virus* (NC_003839) BRV : *Black currant reversion virus* (NC_003502) RpRSV : *Raspberry ringspot virus* (NC_005267) TRSV : *Tobacco ringspot virus* (NC_005096) ArMV : *Arabidopsis mosaic virus* (GQ369530) GFLV : *Grapevine fanleaf virus* (NC_003623) GCMV : *Grapevine chrome mosaic virus* (NC_003621) BRSV : *Beet ringspot virus* (NC_003694) TBRV : *Tomato black ring virus* (NC_004440) CNSV-C : ソテツ分離株 (NC_003792) CNSV-L : ユリ分離株 (JN127337) CNSV-D : ジンチョウゲ分離株 (大嶽, 2012) CNSV-G : グラジオラス分離株 (AB237656)

4. 9 Co-Pro 領域のアミノ酸配列の比較

(1) CNSV 各分離株間での相同性の比較

CNSV 各分離株間の RNA1 にあるプロテアーゼコファクター領域 (Co-Pro 領域) の相同性が、他の領域と比べて低いことから、分離株間でアミノ酸配列の比較を行った。RNA1 の Co-Pro C 末端側・NTB・Vpg・Pro-Pol 領域 (図 2 9 の青の矢印で示した部分) は、CNSV ソテツ分離株に対していずれの分離株も 93% 以上の相同性を示している。それに対し、N 末端側のアミノ酸配列は、配列が決定していないユリ分離株を除いて、ソテツ分離株に対してジンチョウゲ分離株では 76%、本ウイルスでは 32% の相同性であり、特に本ウイルスの N 末端側のアミノ酸配列が大きく異なることが分かった (図 3 0)。

また、それぞれの N 末端側のアミノ酸配列が CNSV 以外に類似しているウイルスがあるのかどうか調べるために、N 末端側のアミノ酸配列の BLAST 検索を行った。ウメ分離株は *Grapevine chrome mosaic virus* (Nepovirus Subgroup B) の Co-Pro 領域と相同性が 34% (Query cover: 99%) であり、続いて *Grapevine Anatorian ringspot virus* (Nepovirus Subgroup B) と相同性が 52% (Query cover: 36%) であった。ソテツ分離株では、*Raspberry ringspot virus* (Nepovirus Subgroup A) と相同性が 35% (Query cover: 54%)、*Potato black ringspot virus* (Nepovirus Subgroup A) と相同性が 52% (Query cover: 10%) であった。また、ジンチョウゲ分離株では *Raspberry ringspot virus* (Nepovirus Subgroup A) と相同性が 33% (Query cover: 51%)、*Blackcurrant reversion virus* (Nepovirus Subgroup C) と相同性が 41% (Query cover: 24%) であった。いずれも *Nepovirus* 属ウイルスとの相同性が見られた。特にウメ分離株については、*Grapevine chrome mosaic virus* との相同性が 34% (Query cover: 99%) であり、特徴的であった。



CNSV_C	1	AKKKQATPAPRPTYPPEVVEKTAAPVIVENVFVEVPTVPSCLAPKMMISICRVEGAPSRAPKQVEMKVMQMRQLLK	80
CNSV_D	1	DVVVNIDEGIEFVYPPLVREGAAAAAPVKVEKTVGVITVPLRIAPVWREERREECTSVKQPKRAIESWVRQMRQLLK	79
CNSV_M	1	NNSINKYLYFNSNISVDLDFSPYRNFDRRLSEAKKYFLSVLVPTYNASFGCKPIGLVETIFSFSSFLIRELGINPYNEL	80
CNSV_C	81	AALTGANSFGPRYVRAHFSRARISWITPQLCEGCLPFWNRRGRLKKSSIALIARIEDTKQCKRAAWEKKBAEELKSKRE	160
CNSV_D	80	AALTGAKTFGPRYVRAHFSRAVSWVYSOLCDAESSLFEQQCLKKSSLSLLKLTESIRQCKRAAWEKKBAEELKSKRE	158
CNSV_M	81	WEEILLANWPTFPGLSLLDCCRTQYDVRREQREARLELQREKKEFLISAATEISNRIGCGFLAAALRYKNGKGVAAALERE	160
CNSV_C	161	YEGRRALLIPLIEMLERRLQDEARELREQLFPSCNFGTDTTKVAAASKAEIKAAAQLKAYQDVCAKVWRVKRQEKKAQQ	240
CNSV_D	159	QEKRVLLIPLIEELVQILQEEARELREQLFPSSGGTDTTKVAAASKAEIKAAAQLKAYQDVCAKVWRVKRQEKKAQQ	238
CNSV_M	161	YKKRMRLLEERMVALKAVAHEEARLREQLFPSSGGGDDTTKVAAASKAEIKAAAQLKAYQDVCAKVWRVKRQEKKAQQ	240
CNSV_C	241	AKLVEDLITSANCKQDVSEPAIEKAARPKRRLEIGDFVPCKLWGLYPCVGLGANMADPVCRVLSACV	309
CNSV_D	239	AKLVEDLITSINCKQDVSEPAIEKAAPKRRTEMVHFVPQNPLWGLYPCVGLGANMADPVCRVLSACV	307
CNSV_M	241	AKLVEDLITSANCKQDVSEPAIEKAARPKRRTEMVHFVPQNPLWGLYPCVGLGANMADPVCRVLSACV	309

※本ウイルスは CNSV-M と表示

図 3 0 . Co-Pro 領域のアミノ酸配列の比較

(2) ウメ分離株間での相同性の比較

各分離株間で相同性が異なる Co-Pro 領域が、宿主範囲等に影響を与えている可能性も考えられたため、異なる CNSV ウメ分離株間で Co-Pro 領域のアミノ酸配列の比較を行った。第五章で報告する、ウメの錦性と CNSV との関係性調査のために神奈川県で採取した‘日光梅’の株を使用し、RNA1 の N 末端側のシーケンス解析を行った。

解析を行ったところ、最初に分離された‘日光梅’のウメ分離株 (CNSV-M) と、神奈川県で採取した‘日光梅’の分離株 (kanagawa) の Co-Pro 領域のアミノ酸配列の相同性は 98% であった。このことから、ウメから分離された両分離株の Co-Pro 領域は非常に類似していることが分かった。(図 3 1)

kanagawa	1	-----	DKRLSEAKKYFLSVLVPTYNASFG	24
CNSV-M	1	AVTLPYCKYNNSLNKYLYFNSNISVDLDFSFYRNF	DKRLSEAKKYFLSVLVPTYNASFG	60
kanagawa	25	GPPIGLVETIFSFSSFLIRELRINPYNELWEETLANWPTFPFVSLLDCCRTQYDVRREQR		84
CNSV-M	61	GPPIGLVETIFSFSSFLIRELRINPYNELWEETLANWPTFPFVSLLDCCRTQYDVRREQR		120
kanagawa	85	EARLELQREKERLLKAATEISNRIGCGFLAAALAYKKGKGAVALEREYKKKMRLLLPR		144
CNSV-M	121	EARLELQREKERLLKAATEISNRIGCGFLAAALAYKKGKGAVALEREYKKKMRLLLPR		180
kanagawa	145	VWALKAAVAHEEARKLREQLFPSGSGGADTTKVAAASKAEIKAAQLKAYQDVCAKVWRV		204
CNSV-M	181	MWALKAAVAHEEARKLREQLFPSGSGGADTTKVAAASKAEIKAAQLKAYQDVCAKVWRV		240
kanagawa	205	KRQEKKAQQAKLVEDLLASANCEKQAVFLPVAEQAARPRRTEMVHIFVPQNPLWGLYPCV		264
CNSV-M	241	KRQEKKAQQAKLVEDLLASANCEKQAVFLPVAEQAARPRRTEMVHIFVPQNPLWGLYPCV		300
kanagawa	265	GLGANMADPVCVLSACV	-----	282
CNSV-M	301	GLGANMADPVCVLSACV		318

図 3 1. CNSV ウメ分離株と kanagawa 株の
Co-Pro 領域のアミノ酸配列の相同性

4. 1 0 本ウイルス特異的プライマーを用いたつまようじ multiplex RT-PCR の開発

以降の調査で大量のサンプルを簡便・迅速に検定する方法として、遠藤ら (2014) が開発したつまようじ multiplex RT-PCR (tm RT-PCR) を用いた簡易診断方法を応用し、本ウイルス特異的プライマーを用いたつまようじ multiplex RT-PCR の開発を行った。

20 μ M の CNSV 特異的プライマー (表 1 2) を使用した場合、18S rRNA のバンドははっきりと確認することができたが、CNSV のバンドが薄く不明瞭となった (図 3 2)。そのため、CNSV 特異的プライマーの濃度を 40 μ M に上げて再度 RT-PCR を行ったところ、18S rRNA と CNSV 両方のバンドをはっきりと確認することができた (図 3 3)。このことから、18S rRNA のプライマーは 5 μ M、CNSV のプライマーは 40 μ M の条件で tm RT-PCR を行うこととした。

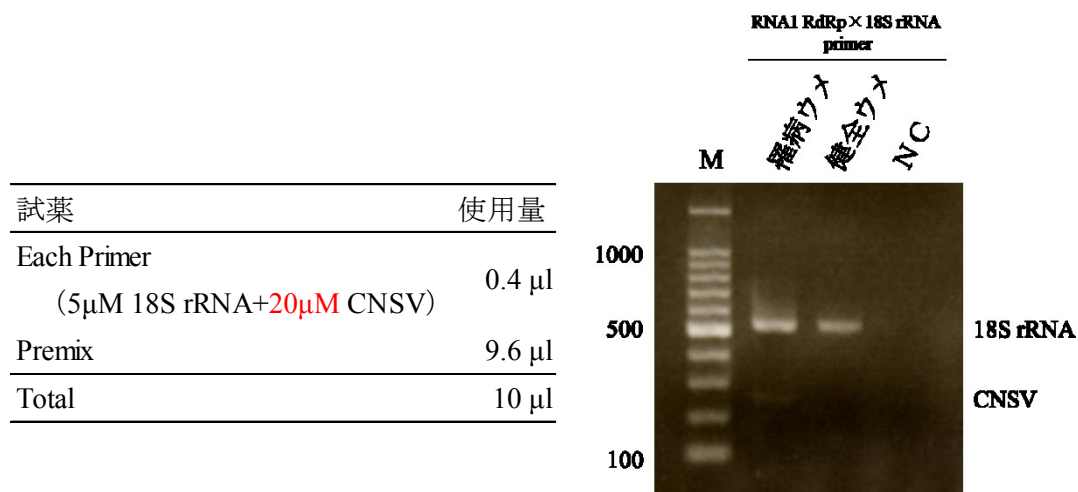


図 3 2. RNA1 RdRp プライマー 20 μ M の tm RT-PCR

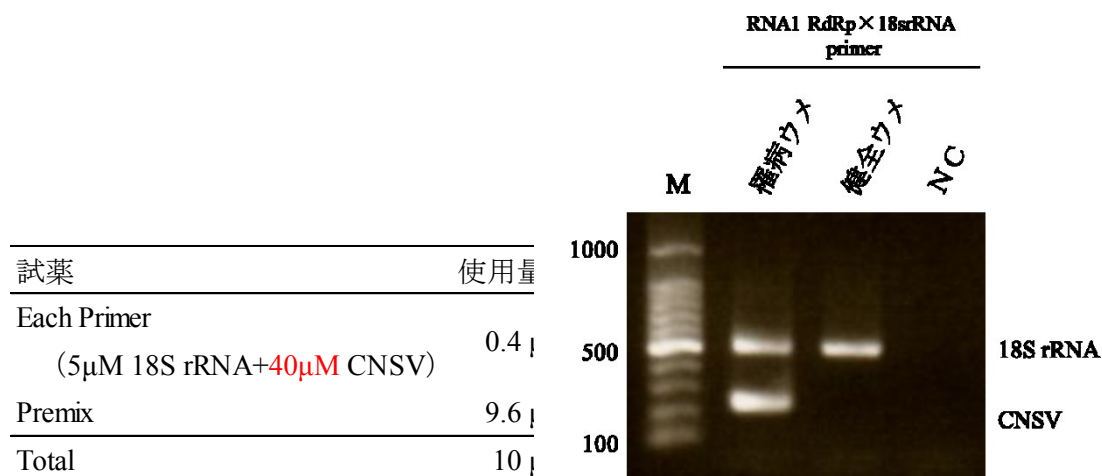


図 3 3. RNA1 RdRp プライマー 40 μ M の tm RT-PCR

4. 1 1 線虫伝染試験

Nepovirus 属ウイルスは、オオハリセンチュウ (*Xiphinema* 属) またはナガハリセンチュウ (*Longidorus* 属) によって媒介されることが知られており、ウイルスを伝搬するそれらの線虫種は、多数報告されている。このことから、*Nepovirus* 属の一種である CNSV も、線虫によって媒介されと考えられているが、現在のところまだ実証はされていない (Han *et al.*, 2002)。そのため、CNSV のベクターを明らかにすること、また、媒介する線虫種を特定するために、線虫伝染試験を行った。今回の試験には、日本産のオオハリセンチュウであるキイチゴオオハリセンチュウ (*Xiphinema bakeri*) を使用した。

まず、接種源である CNSV 感染 *C. quinoa* の根にウイルスが感染していることを確認するために、CNSV 感染 *C. quinoa* の根と葉を ISOGEN を用いて核酸抽出し、CNSV 特異的プライマーを用いた RT-PCR を行った。その結果、葉に病徴を示すすべての株で、葉と根に CNSV が感染していることが確認された (図 3 4)。

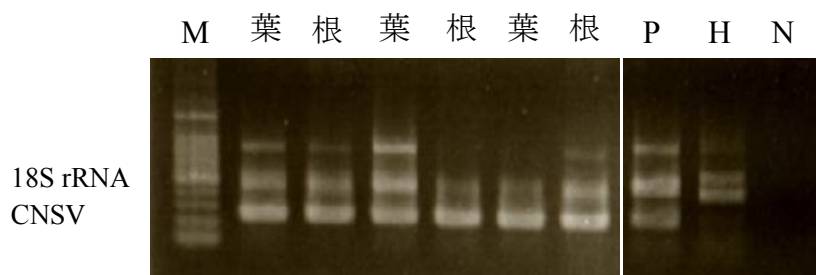


図 3 4. CNSV 感染 *C. quinoa* の葉と根の tm RT-PCR 検定

続いて、接種源（感染 *C. quinoa*）に放飼したキイチゴオオハリセンチュウが CNSV を保持したかどうか確認するために、Nested RT-PCR を用いたウイルス保持検定を行った。線虫伝染試験の接種区とは別に試験を行った。接種源に 2 週間放飼したキイチゴオオハリセンチュウを分離・同定した後、10 頭ずつ計 2 サンプルの核酸抽出を行い、Nested RT-PCR を行った。また、対照区として、飼育していたキイチゴオオハリセンチュウを分離したそのままの線虫を、同様に 10 頭ずつ使用し、計 2 サンプル検定を行った。その結果、接種源に放飼した線虫のサンプルで、いずれも CNSV 陽性が確認された（図 3 5）。1st RT-PCR では、バンドが薄く陽性の判定は難しかったが、2nd RT-PCR (Nested RT-PCR) では、はっきりとバンドを確認することができた。この結果から、キイチゴオオハリセンチュウが CNSV を保持したことが確認された。

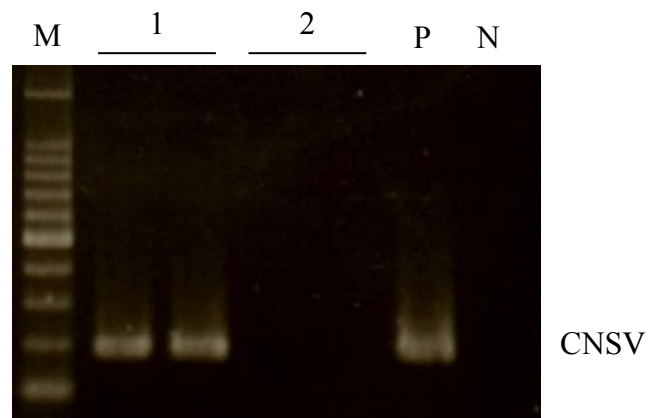


図 3 5．感染 *C. quinoa* に放飼した線虫の
Nested RT-PCR を用いたウイルス保持検定

1 : 感染 *C. quinoa* 放飼線虫 2 : 飼育土壌から分離したそのままの線虫
M : 100bp DNA Ladder P : positive control N : negative control

今回の線虫伝染試験には、1983年に Trudgill らが報告した線虫伝染試験の基準に基づいて、接種区 1 区と対照区 3 区（熱処理区・無接種区・無線虫区）を設けた。検定は、検定植物の *Petunia* × *hybrida* の葉と根の tm RT-PCR を行った。ウイルス保持検定では、キイチゴオオハリセンチュウが CNSV を保持したことが確認されたが、今回の伝染試験ではキイチゴオオハリセンチュウでの伝搬は確認されなかった（表 3 0）。また、対照区はいずれも陰性となっている。

表 3 0．線虫伝染試験結果

	試験区	病徴	tm RT-PCR	
			葉	根
	接種区	—	—	—
対 照 区	熱処理区	—	—	—
	無接種区	—	—	—
	無線虫区	—	—	—

4. 1 2 ウメ実生への戻し接種

ウメ実生への戻し接種は、接ぎ木と汁液接種を用いて行った。接ぎ木接種は、本ウイルスを分離した‘日光梅’の苗木を穂木とし、ウメ実生を台木として芽接ぎ、腹接ぎ、葉柄接ぎを行った。また、汁液接種は、接種後 10~14 日の感染 *C. quinoa* 粗汁液を発芽前ウメ実生へ汁液接種をした。また、部分純化試料のウメ実生苗への汁液接種を行った。いずれも接種一か月後に *C. quinoa* への汁液接種または tm RT-PCR で検定を行ったところ、接種を行った全ての株で CNSV は検出されなかった（表 3 1）。接木接種については、接木を行った時期やそれに伴い活着本数が少なかったことも原因として考えられるが、本ウイルスの台木への移行速度が遅い等の可能性も考えられるため、活着した株については今後も経過観察を行う必要がある（図 3 6）。

表 3 1. ウメ実生への戻し接種結果

		接種本数	活着本数	枯死本数*	検定結果
(接木方法)					
接木接種	芽接ぎ	36	7	6	0/36
	腹接ぎ	10	10	0	0/10
	葉柄接ぎ	37	0	—	0/37
(接種源)					
汁液接種	感染 <i>C. quinoa</i> 粗汁液	70	—	—	0/70
	部分純化試料	75	—	—	0/75

* 活着後に、穂木が枯死したもの



図 3 6. 接ぎ木接種（腹接ぎ）で活着した株

第五章 結果2 - ウメの「錦性」と CNSV との関係性 -

6. 1 ‘日光梅’に見られた「錦性」について

CNSV が検出された品種‘日光梅’に見られた、枝がまだらに黄化する現象は、「錦性」と呼ばれる性質で、これを示す品種は日光梅以外にも‘埤出錦’‘埤出の鷹’‘東錦’等数品種存在することが分かった。

2011 年に購入した‘日光梅’の苗木は、2012 年春の観察では枝の黄色いまだら模様は見られなかったが、同年の 11 月の観察では枝がまだらに黄色くなり錦性を示す様子が観察された。この傾向は 2014 年に購入した‘日光梅’の苗木でも同様であった。また、錦性の模様は年数を経るにつれてだんだんと進行し、今ではほとんどの若枝が一様に黄色くなり、まだら模様は少なくなっている（図 3 7）。



図 3 7. 錦性を示す‘日光梅’の枝 （2014 年 11 月撮影）

6. 2 各地‘日光梅’の CNSV 感染状況調査

購入又は神奈川県、三重県、大阪府の公園等で採取した錦性を示す‘日光梅’の葉又は枝を、CNSV 特異的プライマーを用いた tm RT-PCR を用いて検定したところ、すべての株で CNSV が検出された（表 3 2）。このことから、CNSV が錦性に関係している可能性があると考えられた。

表 3 2. 各地‘日光梅’の CNSV 感染状況調査

	錦性	CNSV検出
2011年・2014年購入苗木	有 (5/5株)	＋ (5/5株)
神奈川県	有 (1/1)	＋ (1/1)
三重県	有 (1/1)	＋ (1/1)
大阪府	有 (1/1)	＋ (1/1)

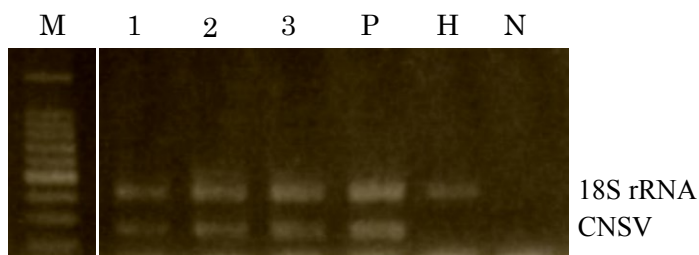


図 3 8. 各地‘日光梅’の tm RT-PCR 検定

1：神奈川県で採取した株 2：三重県で採取した株 3：大阪府で採取した株

M：100bp DNA Ladder P：positive control N：negative control

6. 3 各種ウメ品種の CNSV 感染状況調査

そこで、東京都、神奈川県で採取した錦性を示す 4 品種等と、2011 年に購入した市販ウメ苗木を含むウメ 50 品種 53 検体の CNSV 感染状況調査を行った。その結果、錦性を示す品種はすべての株で CNSV 陽性となり、錦性を示さない品種はすべての株で陰性となった(表 3 3)。また、葉だけでなく枝からも CNSV が検出され、また、緑の部分と黄色の部分のいずれからも検出が可能であった。このことから、ウメの錦性は CNSV がウメに感染することにより引き起こされている可能性が高いと考えられた。

表 3 3. 各種ウメ品種の CNSV 感染状況調査

品種名	錦性	CNSV検出 (tm RT-PCR)
埤出錦	有	＋ (3/3株)
錦性埤出の鷹	有	＋ (1/1)
埤出の鷹	有	＋ (1/1)
東錦	有	＋ (1/1)
雪灯籠	無	－ (0/1)
埤出の鷹枝垂れ	無	－ (0/1)
養老枝垂れ	無	－ (0/1)
翁	無	－ (0/2)
春日野	無	－ (0/1)
その他41品種	無	－ (0/41)

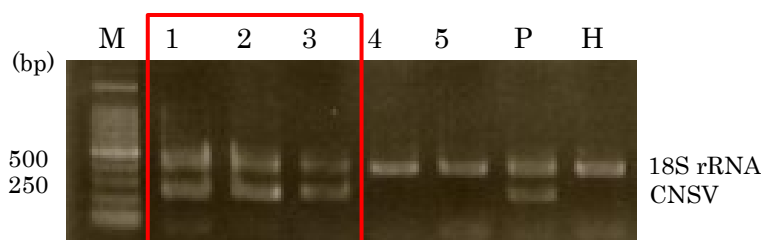


図 3 9. 東京都で採取した品種の tm RT-PCR 検定結果

1 : 埤出錦① 2 : 埤出錦② 3 : 埤出錦③

4 : 埤出の鷹枝垂れ 5 : 養老枝垂れ

P : positive control H : healthy control M : 100bp DNA Ladder

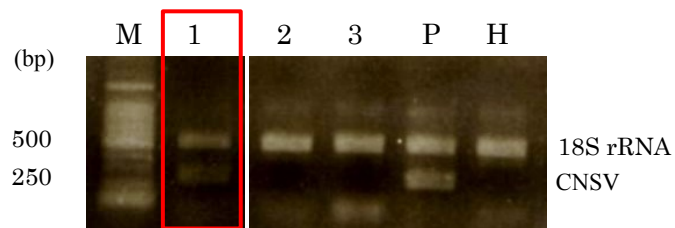


図 4 0．神奈川県で採取した品種の tm RT-PCR 検定結果

1：東錦 2：翁 3：春日野

M：100bp DNA Ladder P：positive control H：healthy control

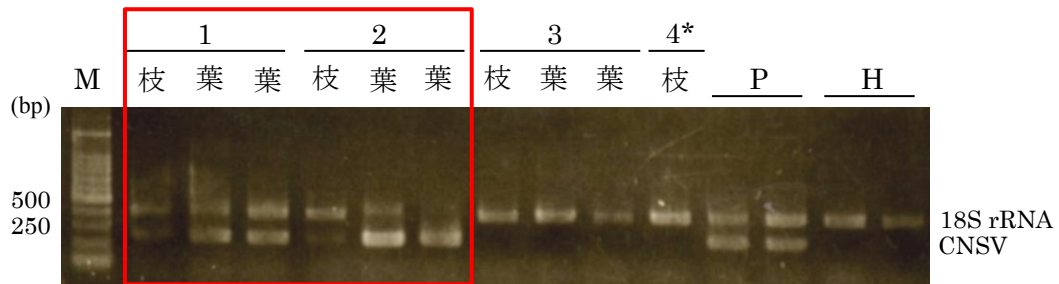


図 4 1．東京都で採取した品種の tm RT-PCR 検定結果

1：埴出の鷹（錦性） 2：埴出の鷹 3：翁 4：雪灯籠

M：100bp DNA Ladder P：positive control H：healthy control

*葉が無かったため、枝のみ検定した

第六章 考察

7. 1 CNSV について

7. 1. 1 ウメ分離株の特徴について

2012 年春に、ウメに感染するウイルスの調査を目的として、市販ウメ苗木 42 品種の汁液接種を行ったところ、品種‘日光梅’から、*C. quinoa* に全身感染し、退緑斑点、えそ、奇形を示す小球状ウイルスが分離された。本ウイルスの汁液接種による宿主範囲調査、物理学的性質調査、部分純化、核酸と外被タンパク質の解析、RT-PCR、塩基配列の解析、系統解析の結果、本ウイルスを *Nepovirus* 属の一種である CNSV と同定した。

宿主範囲調査の結果、本ウイルスは 12 科 24 属 32 種のうち アカザ科やナス科などを中心に 5 科 8 属 13 種の草本植物に感染し、宿主範囲は比較的広いウイルスであることが分かった。つるなの輪紋症状やケイトウ、センニチコウへの感染は、ソテツ分離株、グラジオラス分離株でも見られた特徴であった。また、各分離株で、ナス科とマメ科において感染に違いがあることが認められた。ソテツ分離株では、ナス科植物への感染は見られないとされていたが (Kusunoki *et al.*, 1986)、本ウイルスは、*N. occidentalis* や *Petunia × hybrida* など 4 種のナス科検定植物への感染が認められた。また、グラジオラス分離株ではマメ科植物への感染が認められたが、本分離株とソテツ分離株では感染は認められなかった。このことから、各分離株間で宿主範囲に違いがあることが分かった (表 3 4)。

表 3 4. 各分離株の宿主範囲の比較

		ウメ分離株 (CNSV-M)	ソテツ分離株 (CNSV-C)	グラジオラス 分離株(CNSV-G)
ナス科	<i>N. tabacum</i> ‘White Burley’	+	—	NT
	<i>Petunia × hybrida</i>	+	—	+
マメ科	<i>Glycine max</i> ‘Tsurunoko’	—	—	+
	<i>Pisum sativum</i>	—	—	+

+ : 陽性 - : 陰性 NT : not tested

ソテツ分離株: Kusunoki *et al.*, 1986 グラジオラス分離株: Hanada *et al.*, 2006

本ウイルスの物理学的性質は、耐熱性 65～70℃、耐希釈性 10^{-3} ～ 10^{-4} 、耐保存性 78～89 日であり、表 2 8 で示したように、核果類に感染する他のウイルスや CNSV ソテツ分離株と比較しても、耐保存性が比較的長く、安定性の高いウイルス

スであるということが考えられる。本ウイルスの物理学的性質の特徴の原因として、ウイルスの感染性に関わる外被タンパク質の配列等に何か特徴的な配列を持っているということも考えられる。

Nepovirus 属ウイルスは、直径 25-30nm の球状粒子であり、粒子は Top component、Middle component (RNA2 が含まれている)、Bottom component (RNA1 が含まれている) の 3 粒子で構成されている (Sanfacon *et al.*, 2012)。今回のウイルス粒子の精製では、10~40%ショ糖密度勾配遠心で 2 本のバンドが確認され、電子顕微鏡観察では下のバンドから図 1 8 のような Bottom component とみられる直径約 25nm のウイルス粒子が観察された。上のバンドからは、密集した粒子の様子を観察することができなかったが、Middle component や Top component のような粒子がいくつか観察された。ウイルス粒子の精製は、1986 年の楠木らの CNSV の報告を参考に行った。今回行った方法で、本ウイルスがかなり精製できることが分かったが、今後さらに高純度に精製できる条件を検討し、純化試料を用いて抗血清の作製等を行っていくことができれば良いと考える。

核酸の電気泳動では、約 6000nt と約 4800nt の 2 本のバンドが確認され、本ウイルスが 2 分節の RNA ウイルスであることが分かった。CNSV のソテツ分離株は全塩基配列が決定されており、RNA1 が 7471nt、RNA2 が 4667nt であるが、今回の電気泳動で確認されたバンドはそれよりもやや短いものであった。考えられる原因として、電気泳動によるスマイリングや、抽出した RNA の分解が起きたことなどが考えられる。

部分純化試料の SDS-PAGE、CBB 染色では、約 65kDa と約 58kDa の部分純化試料に特異的な 2 本のバンドが確認された。*Nepovirus* 属ウイルスの外被タンパク質は本来 1 種類であることが分かっているが、1986 年の花田らの報告では、CNSV の外被タンパク質はやや不安定であり、純化試料を長期に凍結保存した場合、タンパク質が分解されやすくなるという記述があった。また、MALDI-TOFMS の結果より、両タンパク質とも CNSV の外被タンパク質と類似していたが、58kDa のタンパク質の C 末端側は、65kDa のタンパク質と比べて 5 アミノ酸程度欠けていた。これらのことから、今回観察された 58kDa のタンパク質は、65kDa のタンパク質が分解されたものである可能性が高いと考えられる。

系統解析では、CP 領域のアミノ酸配列に基づき系統樹を作成した。今回の解析ではユリ分離株からソテツ、ジンチョウゲ、グラジオラス、ウメ分離株の順に系統的に枝分かれしていることが確認された。今後全塩基配列による系統樹を作成し、CNSV の最初の感染源に最も近い宿主植物を特定することができれば面白いと考えている。ウメ分離株のシーケンス解析については、RNA1 と RNA2 共に 5'末端と 3'末端側が解析できていない。RACE 法による解析を試みているが成功していないため、今後も条件検討を行っていく必要があると考えている。

7. 1. 2 各分離株間の Co-pro 領域の相同性について

Co-pro 領域の N 末端側のアミノ酸配列は、各分離株間での相同性が低く、特にウメ分離株で大きな違いが見られた。この領域の配列が宿主植物により異なった場合、宿主範囲に関わる配列が存在している可能性が考えられた。そこで最初に分離された‘日光梅’分離株 (CNSV-M) に加えて、神奈川県で採取した‘日光梅’の CNSV 分離株 (kanagawa) のシーケンス解析を行った。その結果、CNSV-M 株と kanagawa 株のアミノ酸配列の相同性は 98% となり、‘日光梅’から分離された両分離株の Co-Pro 領域の配列は非常に類似していることが分かった。同じ品種から分離された株であるため、増殖の際の親株が同じであるということも考えられることから、他の錦性品種から分離された CNSV の配列も解析する必要があると考える。また、ソテツやジンチョウゲなどについても同様に他の分離株の解析が必要であると考え。2002 年の Han らの報告では、CNSV ソテツ分離株の C 末端側のアミノ酸配列が裸子植物へのウイルス感染の適応に関係しているかもしれないという記述がされていたが、Co-pro 領域の N 末端側にもそのような宿主範囲に関わるような機能があれば面白いと考えている。

また、CNSV-M 株の Co-pro 領域の N 末端側は、CNSV に次いで *Grapevine chrome mosaic virus* との相同性が 34% (Query cover: 99%) であった。ソテツ分離株では、*Raspberry ringspot virus* と相同性が 35% (Query cover: 54%)、ジンチョウゲ分離株では *Raspberry ringspot virus* と相同性が 33% (Query cover: 51%) であった。*Nepovirus* の Co-pro 領域には、同じ *Secoviridae* 科の *Comovirus* の Co-pro 領域で発見された保存されたモチーフが存在することが知られている。そのため、CNSV-M 株の Co-pro 領域には他の *Nepovirus* 属ウイルスと共通した配列があると考えられ、CNSV に次いで *Grapevine chrome mosaic virus* と類似した配列を持つと考えられる。

7. 1. 3 CNSV を媒介するベクターについて

今回の線虫伝搬試験では、キイチゴオオハリセンチュウ *X. bakeri* は CNSV を保持することが確認されたが、伝搬は確認されなかった。この原因としては、キイチゴオオハリセンチュウが CNSV のベクター線虫でなかった可能性があげられる。または、線虫 10 頭から核酸を抽出したにもかかわらず Nested RT-PCR を行わないと CNSV の増幅バンドが確認できなかったことから、1 頭の線虫が植物に伝搬できる濃度のウイルスを保持していなかったことも考えられる。今回の試験では、各試験区の鉢数を増やすための十分な線虫数を確保することが難しく、各試験区に対して一鉢ずつしか試験を行うことができなかった。そのことから、試験を行う前に線虫を十分に増殖させる飼育環境と技術の向上が必要であると考えられる。

今後、CNSV のベクターを探索するにあたって、媒介すると考えられる日本産のオオハリセンチュウやナガハリセンチュウは、表 3 5 に示した 16 種が挙げられる。その中で *Nepovirus* を伝搬することが分かっているものには、*Mulberry ring spot virus* を伝搬するクワナガハリセンチュウ *L. martini* (Yagita and Komuro, 1972) と *Arabis mosaic virus* と *Tomato ringspot virus* を伝搬するキイチゴオオハリセンチュウ *X. bakeri* (Iwaki and Komuro, 1974) (Converse, 1977) の 2 種である。キイチゴオオハリセンチュウの 2 つの報告については、線虫伝搬を証明するための基準を満たしていないため、再検証が必要なものとなっている。

また、ウイルスとそのベクター線虫には特異的な関係があることが分かっている。2004 年の Andret らの報告では、*Nepovirus* 属ウイルスとベクター線虫との特異性には CP 領域のみが関わっていることを示唆しており、ウイルスの特異的な伝染には、ウイルスの外部表面のカプシドと線虫の食道管の特異的なウイルス受容体に関係していると推測している。このことから、CNSV とそのベクター線虫も伝搬において特異的な関係を持っており、それが CP 領域によって決定されている可能性が高いと考えられる。

表 3 5. CNSV を媒介する可能性がある
日本産のオオハリセンチュウとナガハリセンチュウ

和名	学名	和名	学名
(オオハリセンチュウ)		(ナガハリセンチュウ)	
ボンサイオオハリセンチュウ	<i>Xipinema incognitum</i>	クワナガハリセンチュウ	<i>Longidorus martini</i>
ヤマユリオオハリセンチュウ	<i>X. insigne</i>	カラマツナガハリセンチュウ	<i>L. laricis</i>
キイチゴオオハリセンチュウ	<i>X. bakeri</i>	ブナナガハリセンチュウ	<i>L. naganensis</i>
サトウキビオオハリセンチュウ	<i>X. elongatum</i>	リュウキュウナガハリセンチュウ	<i>L. ishigakiensis</i>
ユナラオオハリセンチュウ	<i>X. chambersi</i>	sp. 1 および sp. 2	
オナガオオハリセンチュウ	<i>X. simillimum</i>		
ブラジルオオハリセンチュウ	<i>X. brasiliense</i>		
ユミオオハリセンチュウ	<i>X. arcum</i>		
sp. 1 および sp. 2			

(平田, 2004)

7. 1. 4 CNSV の分布や感染経路について

CNSVは、いままでソテツ、アオキ、ジンチョウゲ、ネギ(Kusunoki *et al.*, 1986)、グラジオラス(Hanada *et al.*, 2006)、ユリ(Wylie *et al.*, 2012)、シャクヤク(Ochoa-Corona *et al.*, 2003)等から分離された報告があり、ウメから分離されたのは今回が初めてとなる。ソテツは裸子植物であり、植物ウイルスが裸子植物から分離されたのはCNSVが初めての報告とされており(Kusunoki *et al.*, 1986)、CNSVは、裸子植物から被子植物(草本植物、木本植物)までの比較的広い宿主範囲を持っている。ソテツは千葉県の株から、グラジオラスは茨城県の株から分離され、また、ユリについては、オーストラリアで日本の琉球列島原産のテッポウユリ *Lilium longiflorum* から分離されている。ニュージーランドの検疫で発見されたシャクヤクの株を除いて、いずれの分離株も日本由来のものとなっている。このことから、CNSVは日本に広く分布しているウイルスの可能性があると考えられる。

ウメは弥生時代に中国から渡来したとされ(農林水産省 online)古くから日本各地で栽培されており、また、ジンチョウゲについても室町時代に中国から渡来したとされている(横井, 1994)。ソテツは日本最古のものが樹齢1000年(平安時代)とされており(静岡県 online)、グラジオラスは南アフリカ原産で明治時代から日本で改良品種が栽培されるようになった(今西, 1995)。また、アオキは日本原産で北海道から沖縄まで広く分布し(清水・塚本, 1994)、テッポウユリについても日本原産で沖縄諸島～四国に分布している(中山ら, 1994)。このようにCNSVの宿主植物の来歴や分布は様々で、感染経路は様々に考えられるが、古来から日本各地で生息または栽培されていたウメやアオキ等がCNSVの感染源となり、線虫により伝搬され日本に広く分布するようになった可能性も考えられる。

7. 2 ウメの「錦性」と CNSV との関係性

各種ウメ品種の CNSV 感染状況調査の結果、錦性を示す品種は全ての株で CNSV が検出され、錦性を示さない株からは検出されなかった。このことから、ウメの錦性は CNSV によって引き起こされている可能性が高いと考えられる。錦性を示す品種は樹勢が弱く栽培には注意が必要であることが知られているが（須崎輝男, 1996）、これはウイルス感染による影響ではないかと考えられる。ウメは中国から弥生時代に渡来したとされ、また、錦性品種は江戸時代に著された『草木奇品家雅見』（金太, 1827）（図 4 1 左）や明治時代に著された『梅譜』（小川, 1899）（図 4 1 右）に記載されていることから、古くから全国各地に植栽されていたものと考えられる。とりわけ江戸時代の園芸は、斑入り、矮小、葉変わり（異形葉）などの異品・奇品が好まれ、世界に類を見ないほど発達したことで知られている（国立国会図書館 online）。また、錦性品種の‘日光梅’や‘埤出錦’は紅色で八重咲きの中輪の花を咲かせ、‘埤出の鷹’は紅淡色で一重咲きの大輪の花を咲かせることから（妻鹿, 1994）、その花色と錦のコントラストの美しさから珍重され、現在まで接ぎ木などで増殖され錦性が維持されてきたものと考えられる。なお、枝に白色の筋が入り、葉には白色の斑が入る‘翁’も変わり品種として古くから知られているが、これからは CNSV は検出されなかった。また、錦性とよく似て枝に黄色く筋が入る筋入り品種についても、今後調査を行う必要があると考えている。

本ウイルスは、接木接種や汁液接種によるウメ実生への戻し接種が成功していないことから、他のウメ品種への感染性はそれほど強くないウイルスであると考えられるが、品種維持の目的以外で感染株を他の品種へ接木しないこと、感染株の根元の土を移動させないこと等の対策が必要と考えられる。

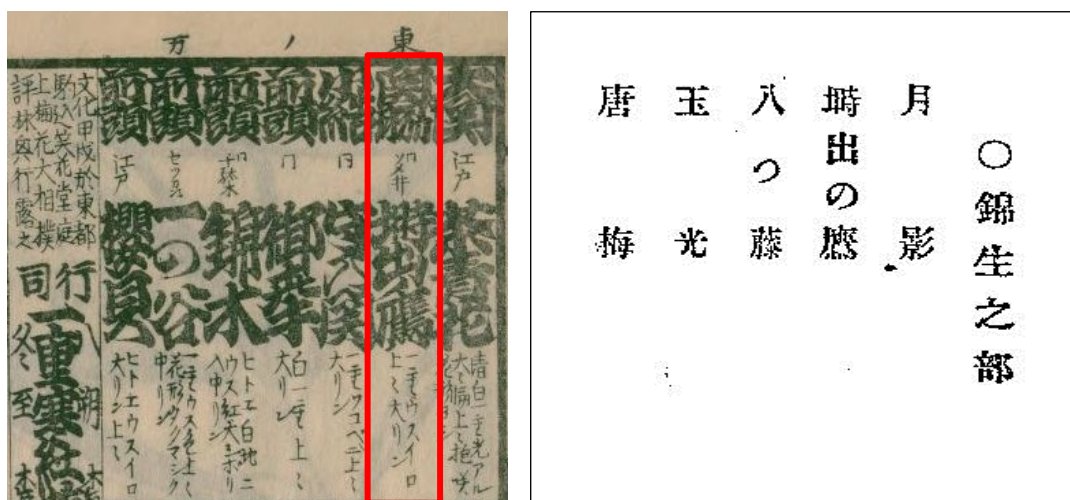


図 4. 『草木奇品家雅見』梅の花の番付表に記載されている埤出の鷹（左）と『梅譜』に記載されている錦性品種（右）

要旨

ウメに感染するウイルスの調査を目的として、市販ウメ苗木 42 品種からウイルスの検出を試みたところ、枝がまだらに黄化し、葉に葉脈黄化を示す品種‘日光梅’から *Chenopodium quinoa* に全身えそ症状を呈するウイルスが分離された。本ウイルスの宿主範囲は比較的広く、物理学的性質は比較的強いことが分かった。感染 *C. quinoa* から部分純化を行ったところ直径約 25 nm の球状粒子が観察された。部分純化試料を用いた SDS-PAGE では約 65 kDa と約 58kDa のタンパク質が認められ、このタンパク質は MALDI-TOFMS で *Cycas necrotic stunt virus* (CNSV) の外被タンパク質に類似していることが分かった。*Nepovirus* 属 Subgroup 特異的プライマーを用いた RT-PCR では *Nepovirus* 属 Subgroup B のウイルスであることが確認された。シーケンス解析では CNSV ソテツ分離株のアミノ酸配列と CP 領域で 93%、Pro-Pol 領域で 96%の相同性を示した。以上のことから、分離されたウイルスは CNSV と同定した。CNSV がウメから検出されたのは今回が初めてである。

また、‘日光梅’に見られた枝がまだらに黄化する現象は、「錦性」と呼ばれる品種特異的な特徴であり、いくつかのウメ品種にも見られることが分かった。購入又は各地で採取した他 8 株の‘日光梅’からも全ての株で CNSV が検出されたことから、錦性が CNSV 感染によるウイルス症状であることが疑われた。そのため、錦性 4 品種を含んだ 50 品種 53 検体の CNSV 感染状況調査を行ったところ、錦性品種は全ての株で CNSV が検出され、錦性を示さない品種からは検出されなかった。古くから愛好家に珍重されてきたウメの錦性は CNSV 感染症状の可能性がある。

謝辞

本研究を行うにあたりご指導いただいた法政大学応用植物医科学研究室の西尾健教授に深く感謝し、御礼申し上げます。

また、キイチゴオオハリセンチュウを分譲していただいた横浜植物防疫所の久井潤也様、錦性についてご指導いただいた東京大学大学院理学系研究科付属植物園山口正様に深く感謝いたします。

また、本研究を行うにあたり、ご指導、ご助言をいただいた川合昭様、遠藤三千雄様、永吉秀光様、太田智子様、前野絵里子様、鍵和田聡専任講師に深く御礼申し上げます。

そして、共に研究生活を過ごした応用植物医科学研究室のみなさまに深く感謝いたします。

引用文献

- (1) Andret, P., Schmitt, C., Demangeat, G., Komar, V. and Fuchs, M. (2004) The specific transmission of *Grapevine fanleaf virus* by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. *Virology* 320: 12-22.
- (2) Brown, D. J. F., Trudgill, D. L. and Robertson, W. M. (1996) Nepoviruses : Transmission by Nematodes. *The Plant Viruses* pp. 187-209.
- (3) Converse, R. H. (1977) Rubus virus diseases important in the United States. *Hort Science* 12: 471
- (4) 遠藤三千雄・蝶名林春香・山井加奈美・菅原優司・加藤綾奈・小野剛・勝木俊雄・川合昭・鍵和田聡・西尾健 (2014) つまようじを用いた multiplex RT-PCR によるウメ輪紋ウイルスの簡易診断. 日本植物病理学会大会プログラム講演要旨集 177. (講要)
- (5) Han, S.S., Karasev, A.V., Ieki, H. and Iwanami, T. (2002) Nucleotide sequence and taxonomy of *Cycas necrotic stunt virus*. *Archives of Virology* 147: 2207-2214.
- (6) Hanada, K., Kusunoki, M. and Iwaki, M. (1986) Properties of virus particles, nucleic acid and coat protein of *cycas necrotic stunt virus*. *The Phytopathological Society of Japan* 52: 422-427.
- (7) Hanada, K., Fukumoto, F., Kusunoki, M., Kameya-Iwaki, M., Tanaka, Y. and Iwanami, T. (2006) *Cycas necrotic stunt virus* isolated from gladiolus plants in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 72: 383-386.
- (8) 平田賢司 (2004) オオハリセンチュウ・ナガハリセンチュウ —*Xiphinema* 属・*Longidorus* 属—. 植物防疫特別増刊号 No. 8 線虫の見分け方 pp. 56-60.
- (9) 今西英雄 (1995) 原産と来歴(グラジオラス). 農業技術体系 第10巻. p. 203.

- (10) 稲田利文・塩見春彦 (2008) ホルムアルデヒド-アガロース電気泳動. RNA 実験ノート 上巻 RNA の基本的な取り扱いから解析手法まで. 羊土社, 東京. pp47-50.
- (11) Iwaki, M., and Komuro, Y. (1974) Viruses isolated from narcissus (*Narcissus* spp.) in Japan. V. Arabis mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 40: 344-353.
- (12) 金太撰輯 (1827) 草木奇品家雅見 3 巻.
- (13) 国立国会図書館 (2005) 江戸時代の園芸.
http://www.ndl.go.jp/nature/column/column_4.html (2015 年 2 月 21 日)
- (14) 栗原潤・都丸敬一・大坪孝之・夏秋啓子・有本裕 (2005) キュウリモザイクウイルスおよびプルヌスネクロティックリングスポットウイルス類縁ウイルスの重複感染によるウメの新病害, ウメ葉縁えそ病. 東京農業大学農学集報 50 (4) : 95-105
- (15) Kusunoki, M., Hanada, K., Iwaki, M., Chang, M. U., Doi, Y. and Yora, K. (1986) Cycas necrotic stunt Virus, a New Member of Nepoviruses Found in *Cycas revoluta* Host Range, Purification, Serology and Some Other Properties. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 52: 302-311.
- (16) 前島健作・萱野佑典・姫野未紗子・濱本宏・山次康幸・難波成任 (2009) Plum pox virus (プラムポックスウイルス) の国内における発生. 植物防疫 63 (9) : 42-46.
- (17) Marais, A., Faure, C. and Svanella-Dumas, L. (2008) First report of Cherry virus A in *Prunus mume* in China. *Plant Disease* 92: 1589.
- (18) 丸山千尋 (2013) ウメに感染するウイルスの調査ー品種‘日光’から分離されたウイルスー. 法政大学生命科学部生命機能学科植物医科学専修卒業論文.
- (19) 妻鹿加年雄・富田栄一・北村四郎・加藤義範・齊藤正二・水上静夫 (1994) ウメ. 園芸植物大辞典 (塚本洋太郎 総監修). 小学館, 東京. pp. 289-300.

- (20) 中山昌明・明道博・塚本洋太郎・加藤憲市 (1994) ユリ属. 園芸植物大辞典 (塚本洋太郎 総監修). 小学館, 東京. pp. 2638-2651.
- (21) 農林水産省 (2011) 果樹のページ.
<http://www.maff.go.jp/index.html> (2015 年 2 月 23 日)
- (22) 農林水産省 (2012) 春夏秋冬梅づくり. aff 2 月号.
http://www.maff.go.jp/j/pr/aff/1202/spe2_01.html (2015 年 2 月 21 日)
- (23) Ochoa-Corona, F. M., Elliot, D. R., Tang, Z., Lebas, B. S. M. and Alexander, B. J. R. (2003) Detection of *Cycas necrotic stunt virus* (CNSV) in post-entry quarantine stocks of ornamentals in New Zealand. *Phytopathology* 93: S67.
- (24) 小川安村 (1899) 梅譜. 東京三田育種場. P. 92.
- (25) 大嶽正樹 (2012) ジンチョウゲに感染する病原ウイルスの解析. 法政大学生命科学部生命機能学科植物医科学専修卒業論文
- (26) Sanfacon, H., Iwanami, T., Karasev, A. V., van der Vlugt, R., Wellink, J., Wetzels, T. and Yoshikawa, N. (2012) *Secoviridae*. in *Virus taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (King, A. M., Adams, M. J., Carstens, E. B. and Lefkowitz, E. J., eds.). Elsevier, Waltham. pp. 881-899.
- (27) 佐藤昭二・後藤正夫・土居養二 (1983) ウイルス核酸の抽出. 植物病理学実験法 (後藤正夫 編). 講談社, 東京. pp. 173-175.
- (28) 柴田忠裕 (2012) 植木・盆栽類を安全に輸出するための線虫対策. 植物防疫 66: 1
- (29) 清水隆夫・塚本洋太郎 (1994) アオキ属. 園芸植物大辞典 (塚本洋太郎 総監修). 小学館, 東京. pp. 20-22.
- (30) 静岡県 ソテツ (龍華寺). ふじのくに文化資料データベース.
<http://www.fujinokunibunkashigen.net/resouce/main.php?search=category&mode=detail&article=743> (2015 年 2 月 21 日)

- (3 1) 須崎輝男 (1996) 日本の花ウメの分類. 日本の梅・世界の梅. (堀内昭作 編) . 養堅堂, 東京. pp. 51-74.
- (3 2) 高橋勤・斉藤範彦・後藤正昭・川合昭・難波成任・山下修一 (1990) 隔離検疫中のウメ苗木から分離された Apple stem grooving virus. 植物防疫所調査研究報告 26: 15-21.
- (3 3) Taylor, C. E., and Robertoson, W. M. (1969) The location of of raspberry ringspot and tomato black ring viruses in the nematode vector, *Longidorus elongates* (De Man). *Ann. Appl. Biol.* 64:233
- (3 4) Taylor, C. E., and Robertoson, W. M. (1975) Acquisition, retention and transmission of viruses by nematodes. In *Nematode Vectors of Plant Viruses* (F. Lamberti, C. E. Taylor, and J. W. Seinhorst, eds.) . Plenum Press, New York. pp. 253-276.
- (3 5) Trudgill, D. L., Brown, D. J. F. and McNamara, D. G. (1983) Methods and criteria for assessing the transmission of plant viruses by longidorid nematodes. *Revue Nematol.* 6 (1) : 133-141.
- (3 6) Wei, T., Clover, G. (2008) Use of primers with 5'non-complementary sequences in RT-PCR for the detection of nepovirus subgroups A and B. *Journal of Virological Methods* 153: 16-21.
- (3 7) Wylie, S. J., Luo, H., Li, H. and Jones, M. G. K. (2012) Multiple polyadenylated RNA viruses detected in pooled cultivated and wild plant samples. *Archives of Virology* 157: 271-284.
- (3 8) Yagita, H., and Komuro, Y. (1972) Transmission of mulberry ringspot virus by *Longidorus martini* Merny. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 38: 275
- (3 9) 山口昭 (1985) 果樹ウイルス病防除に関する研究. 日本植物病理学会報 51: 258-260

(40) 横井政人 (1994) ジンチョウゲ属. 園芸植物大辞典(塚本洋太郎 総監修).
小学館, 東京. pp. 1182-1184.

参考文献

- (1) Clover, G. R. G., Pearson, M. N., Elliot, D. R., Tang, Z., Smales, T. E., Alexander, B. J. R. (2003) Characterization of a strain of *Apple stem grooving virus* in *Actinidia chinensis* from China. *Plant Pathology* 52: 371-378.
- (2) Discription of plant viruses *Nepovirus*.
<http://www.dpvweb.net/index.php> (2015 年 2 月 21 日)
- (3) Fraenkel-Conrat, H., Singer, B. and Tsugita, A. (1961) Purification of viral RNA by means of bentonite. *Virology* 14 : 54-58.
- (4) Gokalp, K., Digiario, M., Cigsar, I., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., De Stradis, A., Boscia, D. and Martelli, G. P. (2003) Properties of previously undescribed nepovirus from South-East Anatolia. *Journal of Plant Pathology* 85 (1) :35-41.
- (5) Halgren, A., Ioannis, E. Tzanetakis. and Robert, R. Martin. (2006) Identification, Characterization, and Detection of Black raspberry necrosis virus. *Phytopathology* 97: 44-50.
- (6) Jaroslav, P., Michara, Michala, C., Milan, J. (2004) Biological and Serological Procedures to Detect Three Nepoviruses in Fruit Trees. *Plant Protect. Sci.* 40: 121-127.
- (7) Martelli.G.P and Uyemoto.J.K (2011) Nematode-Borne Viruses of Stone Fruits. In *Virus and Virus-Like Disease of Pome and Stone Fruits* (Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T., and Jelkman, W., eds.). The American Phytopathological Society, Minnesota. pp. 161-170.
- (8) MC Elroy, F. D. (1972) Studies on the Host Range of *Xiphinema bakeri* and Its Pathogenicity to Raspberry. *Journal of Nematology* 4: 16-22.
- (9) 西尾健, 川合昭, 小林敏郎 (1981) 輸入検疫中のオランダ産アネモネから分離された *Raspberry ring spot virus*. 植物防疫所調査研究報告 17: 35-42.

- (1 0) 西尾健・川合昭・高橋勤・難波成任・山下修一 (1989) カンキツタターリーフウイルスの純化ならびに諸性質. 日本植物病理学会報 55: 254-258
- (1 1) Sutherland, J. R. and Ross, D. A. (1971) Temperature Effects on Survival of *Xiphinema bakeri* in Fallow Soil. *Journal of Nematology* 3: 276-279.
- (1 2) Sutherland, J. R. and Sliggett, L.J. (1973) Time, Temperature, and Soil Moisture Effects on *Xiphinema bakeri* Nematode Survival in Fallow Soil. *Phytopathology* 64: 508-513.
- (1 3) Thompson, J. R., Leone, G., Lindner, J. L., Jelkmann, W. and Schoen, C. D. (2002) Characterization and complete nucleotide sequence of Strawberry mottle virus: a tentative member of a new family of bipartite plant picorna-like viruses. *Journal of General Virology* 83: 229-239.
- (1 4) Wilcockson, J. and Hull, R. (1974) The Rapid Isolation of Plant Virus RNAs using Sodium Perchlorate. *J. gen. ViroL.* 23 : 107-111.